DNA

فصلنامه علمی-تخصصی دانشجویی بیوتکنولوژی دانشگاه الزهرا(س)

شماره ۴۰ - بهار ۱۴۰۱

آنچه در این شماره می‌خوانیم

درمان کم‌خونی داسی‌شکل؛ قهرمانی به نام کریسپر!

یک‌قدم با پارکینسون؛ تکنولوژی ارگانوئید

تکمیل پروژهٔ ژنوم انسان؛ دستاورد مهم قرن ۲۱

رقابتی سرنوشت‌ساز در چشم

اسکوالن میکروبی؛ حامی اکوسیستم دریایی

تکنولوژی ارگانوئید

دانشگاه الزهرا

بسم الله الرحمن الرحیم

DNA

فصلنامه علمی- تخصصی دانشجویی
بیوتکنولوژی دانشگاه الزهرا(س)

فصلنامه بهار ۱۴۰۱- شماره ۴۰ سال
هفد هم

صاحب امتیاز:
انجمن بیوتکنولوژی دانشگاه الزهرا(س)
مدیر مسئول:
سمیرا کمیجانی
سردبیر:
بهار مانی
هیئت تحریریه:

تارا شاهمرادی، مهدیه سپهری، شایسته مقدم راد، امیرعلی وزیری، سیده محبوبه موسوی
ویراستاری:
فاطمه دهقان، بهار مانی
صفحه‌آرا و طراح جلد:
بیتا سعادتیان مقدم
استاد مشاور:
دکتر سید ابوالقاسم قدمی

چاپ:
دانشگاه الزهرا(س)
نشانی:
تهران، ونک، دانشگاه الزهرا(س)، ساختمان معاونت فرهنگی و اجتماعی دانشگاه الزهرا(س)
رایانامه:
DNAmagazine98@gmail.com

سخن سردبیر

پیشرفت پرشتاب علم و فناوری با بهره‌گیری از ایده‌های نوآورانه، باعث شده که هر زیست‌شناس نگرش جدیدی نسبت به ارگانیسم‌های زنده و محیط‌زیست داشته باشد. منشأ این نوآوری به زمانی بازمی‌گردد که هر انسان در مواجهه با مسائل پیش رو پیوسته تفکر می‌کند و با خارج کردن ذهن از یک چارچوب ثابت، امور مختلف را به شکل جدیدی به هم ارتباط می‌دهد. پیگیری یک رویکرد خلاقانه برای دانشمندان نیز بسیار بااهمیت است؛ چراکه بهره‌گیری از همین رویکرد باعث شده در حال حاضر از فناوری ویرایش ژن کریسپر یا همان سیستم دفاعی اختصاصی باکتری‌ها، به‌منظور درمان بیماری‌های انسانی کمک بگیرند که تنها با جایگزینی نادرست یک آجر ساختمانی در پروتئین خاصی از گلبول قرمز رخ می‌دهد.

علاوه بر این، با همین دیدگاه نوین است که می‌توان به نسخه‌های مینیاتوری از یک اندام انسانی دست یافت. درواقع ارگانوئیدها یکی از تکنیک‌های کشت بافت سه‌بعدی به شمار می‌آیند که علاوه بر ارائه بینش جدید در مورد بیماری‌ها و سایر کاربردهای متنوع، نگرانی‌های به‌کارگیری حیوانات آزمایشگاهی را تا حدودی برطرف می‌کنند. همچنین می‌توان به‌جای آسیب زدن به اکوسیستم دریایی، با استفاده از میکروارگانیسم‌ها به ترکیبات هیدروکربنی مدنظر صنعت دست یافت.

شایان ذکر است، پروژه ژنوم انسان که پس از ده‌ها سال به‌تازگی (آوریل ۲۰۲۲) تکمیل شده است، می‌تواند برای هر محققی پنجره‌ای گشوده شده به دنیای ناشناخته‌ها باشد.

به این ترتیب امید است با ارائه مطالب این شماره از نشریه DNA که شاید تنها گوشه‌ای از رویکردهای نوآورانه در حیطه علوم زیستی باشند، بتوانیم آن‌ها را نزد همراهان گرامی معرفی کنیم.

بهار مانی
خرداد ۱۴۰۱

۱۱
یک قدم با پارکینسون؛ تکنولوژی ارگانوئید

۵
درمان کم‌خونی داسی شکل؛ فهرمانی به نام کریسپر

۲۳
رقابتی سرنوشت‌ساز در چشم

۱۹
تکمیل پروژهٔ ژنوم انسان؛ دستاورد مهم قرن ۲۱

۳۳
اسکوالن میکروبی؛ حامی اکوسیستم دریایی

درمان کم‌خونی داسی شکل؛ قهرمانی به نام کریسپر!

تارا شاهمرادی
دانشجوی کارشناسی بیوتکنولوژی دانشگاه الزهرا تهران

فناوری کریسپر[۱](CRISPR)ابزار قدرتمندی برای ویرایش ژنوم است؛ به این معنی که اجازه می‌دهد محققان به‌راحتی توالی‌های DNA را تغییر دهند و عملکرد ژن را اصلاح کنند.

این فناوری کاربردهای بالقوه زیادی دارد که می‌توان به اصلاح نقایص ژنتیکی، درمان و جلوگیری از گسترش بیماری‌ها، بهبود رشد و مقاومت محصولات کشاورزی اشاره کرد (۱). سیستم CRISPR–Cas برای اولین بار در سال ۱۹۸۷ در ژنوم باکتری *Escherichia coli* به‌عنوان یک سیستم ایمنی اختصاصی در برابر باکتریوفاژها و ورود DNA خارجی مانند پلاسمیدها به درون سلول باکتری شناسایی شد و به‌دنبال آن در سال ۲۰۰۰ خانواده‌های ژنی CRISPR در تمام پروکاریوت‌ها شناسایی شدند (۲).

دو محققی که فناوری ویرایش ژن CRISPR را اختراع کردند، در سال ۲۰۲۰ موفق به دریافت جایزه نوبل شیمی شدند (۳).

در مقاله‌ای از Damiano Rondelli و همکاران که در سال ۲۰۲۱ منتشر شد، دو بیمار مبتلا به تالاسمی بتا[۲]و کم‌خونی داسی شکل[۳] پس از ویرایش ژن برخی از سلول‌ها با فناوری CRISPR درمان شدند. تا زمان نشر این خبر، ۹۰۰ بیمار مبتلا به کم‌خونی داسی شکل برای درمان این بیماری با استفاده از CRISPR به یکی از بیمارستان‌های شیکاگو مراجعه کردند که به معنای اهمیت بالای این موضوع است. دو بیمار اول که درمان را دریافت کرده‌اند همچنان تحت‌نظر هستند (۳).

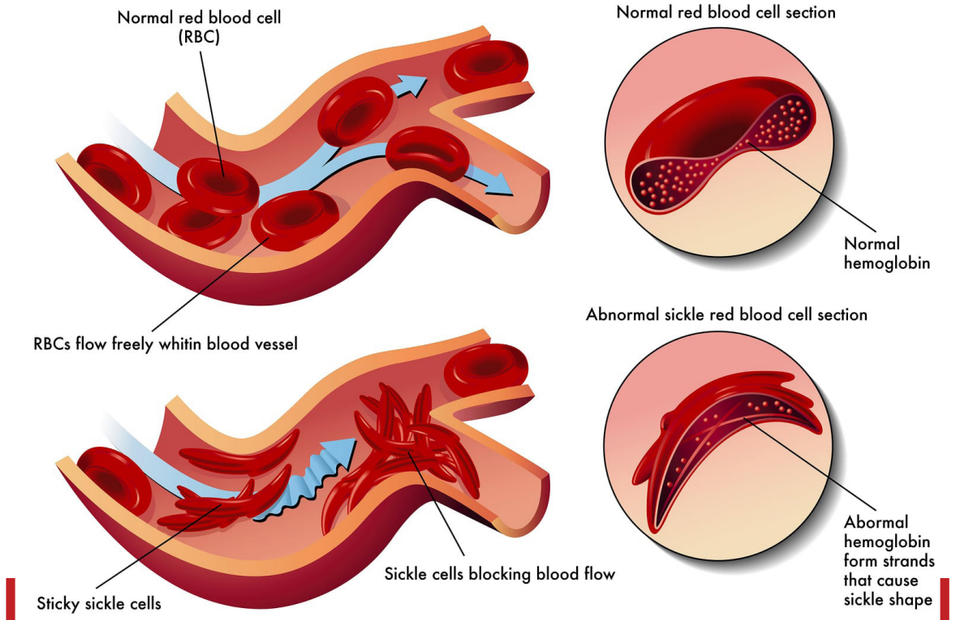
هموگلوبینوپاتی[۴] به گروهی از بیماری‌ها گفته می‌شود که در اثر جهش ژن پروتئین هموگلبین ایجاد می‌شوند. از این دسته بیماری‌ها می‌توان به تالاسمی و کم‌خونی داسی شکل اشاره کرد (۴).

در تالاسمی بتا کمبود یا عدم تولید β–گلوبین و در نتیجه عدم تعادل بین α–گلوبین و β–گلوبین رخ می‌دهد. بیش از ۲۰۰ جهش نقطه‌ای گزارش شده است که باعث تالاسمی بتا با درجه‌های مختلف می‌شود (۵ و ۶).

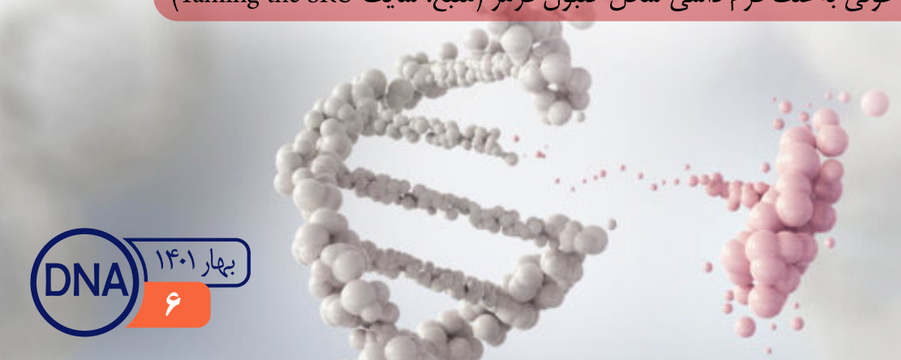
۱ Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
۲ β–Thalassemia
۳ Sickle cell anemia
۴ Hemoglobinopathy

بیماری کم‌خونی داسی شکل نیز یک نقص موروثی هموگلوبین است و یکی از شایع‌ترین بیماری‌های ژنتیکی در سراسر جهان است (۳). در حال حاضر بیش از شش میلیون نفر با این بیماری زندگی می‌کنند که سه‌چهارم آن‌ها در جنوب صحرای آفریقا هستند.

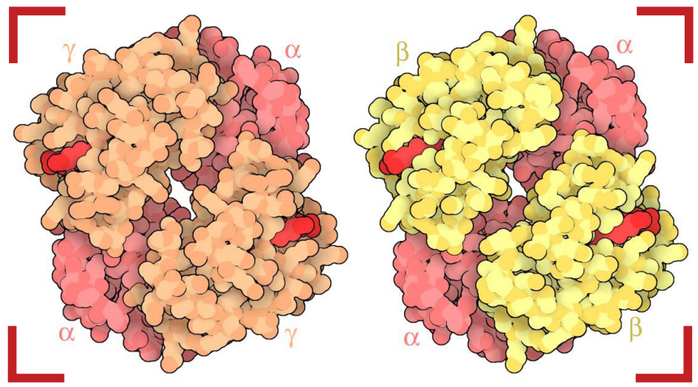
گفته می‌شود آمار مرگ‌ومیر در دوران کودکی به دلیل کم‌خونی داسی شکل همچنان بالا باقی مانده است. این بیماری باعث می‌شود گلبول‌های قرمز خون داسی شکل شوند (۷). این سلول‌ها می‌توانند رگ‌های خونی کوچک را مسدود و بافت‌های بدن را از اکسیژن محروم کنند. این بیماری می‌تواند باعث درد شدید و آسیب به ریه، قلب، کلیه، کبد و حتی در مواقع حاد منجر به مرگ شود (۳).



شکل ۱. انسداد عروق خونی به‌علت فرم داسی شکل گلبول قرمز (منبع: سایت Taming the SRU)



هر دوی این بیماری‌ها در اثر جهش نقطه‌ای در ژن بتاگلوبین[۵] (HBB) ایجاد می‌شود که روی کروموزوم ۱۱ قرار دارد (۸). از لحاظ ساختاری، هموگلوبین جنینی[۶] (HbF)فاقد زیرواحد بتا است و توانایی به‌دست آوردن این جهش را ندارد؛ بنابراین نوزادانی که حامل ژن سلول داسی هستند، از علائم بیماری کم‌خونی داسی شکل رنج نمی‌برند. در بدن نوزادان، بیشتر HbF ساخته می‌شود، اما در اواخر دوران کودکی با تغییر نوع سنتز به هموگلوبین بالغ[۷] (HbA)دچار مشکل می‌شوند (۹).



شکل ۲. ساختار HbF و HbA. زیرواحدهای آلفا به رنگ صورتی، زیرواحدهای گاما به رنگ نارنجی، زیرواحدهای بتا به رنگ زرد و هِم‌ها به رنگ قرمز نشان داده شده‌اند (۹).

پیش از این، یکی از راه‌های درمانی مؤثر این بیماری‌ها پیوند سلول‌های بنیادی مغز استخوان بود. کارآزمایی‌های جدیدی در حال بررسی پتانسیل فناوری CRISPR به‌عنوان ابزاری برای درمان این وضعیت مزمن هستند (۷). در مقاله منتشرشده در مجله پزشکی نیوانگلند، نشان داده شد که استفاده از فناوری CRISPR برای درمان بیماری‌های تالاسمی بتا و کم‌خونی داسی شکل با اصلاح ژن سلول‌های بنیادی خون‌ساز[۸] (HSPCs) و حذف ژنی که مسئول سرکوب تولید HbF است، می‌تواند به درمان این بیماری‌ها منجر شود (۳). مطالعات نشان داده‌اند که وجود نزدیک به ۲۰درصد HbF در خون، برای کاهش علائم بیماری سلول داسی شکل کافی است؛ بنابراین محققان برای افزایش سطح HbF در افرادی که حامل جهش سلول داسی هستند از ژن‌درمانی استفاده می‌کنند (۹).

پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی[۹] (SNPs) مرتبط با افزایش بیان HbF در بزرگسالان شناسایی شده که برخی از آن‌ها در لوکوس BCL11A (ژنی در کروموزوم شماره دو) قرار دارند. این SNP ها با شدت کمتر هر دو بیماری در ارتباط هستند. BCL11A یک فاکتور رونویسی را بیان می‌کند که در افراد بالغ، باعث سرکوب بیان گاماگلوبین و HbF در سلول‌های خاص مغز استخوان(سلول‌های اریتروئیدی[۱۰]) می‌شود.

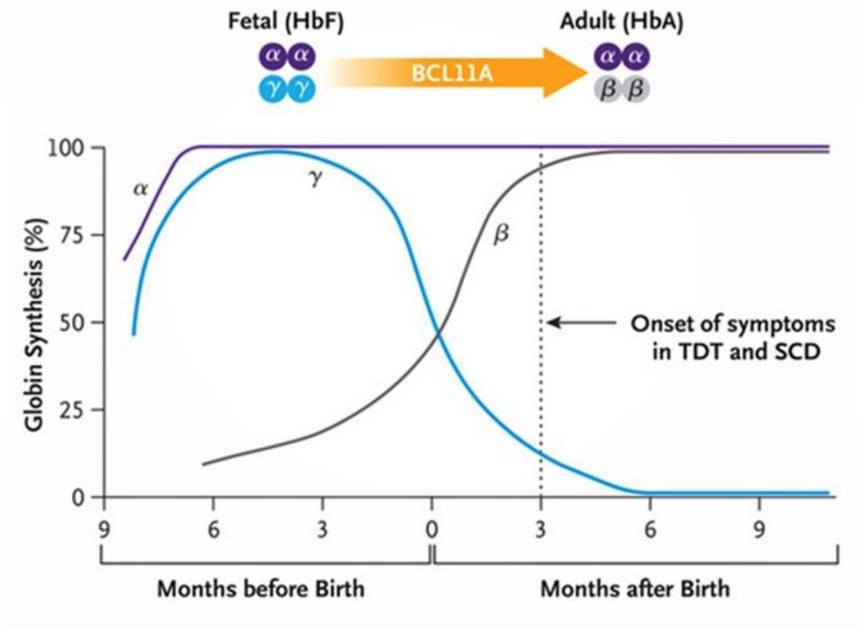
این SNPها، بیان BCL11A را

۵ Hemoglobin Subunit Beta
۶ Adult Hemoglobin
۷ Fetal Hemoglobin
۸ Hematopoietic Stem and Progenitor Cells
۹ SNP (مخفف Single Nucleotide Polymorphisms) به معنای تفاوت یافت‌شده در یک نوکلئوتید نسبت به موقعیت مشابه آن در توالی‌های DNA است.
۱۰ Erythroid cells

کاهش داده و HbF را افزایش می‌دهند، پس تولید دوبارهٔ HbF فعال می‌شود (۸).

حال بیماران مبتلابه نقص هموگلوبین همراه تولد (تالاسمی بتا یا کم‌خونی داسی شکل)، HbF کافی را برای غلبه بر اثر هموگلوبین معیوب کسب می‌کنند (۳).

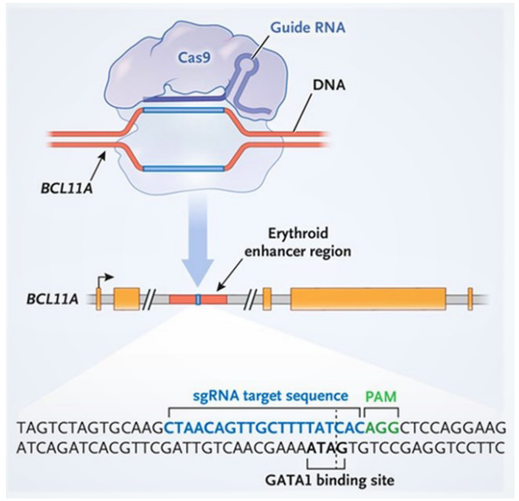
افزایش سطح HbF با بهبود عوارض این بیماری‌ها همراه است؛ چراکه بیشتر اوقات بیماران با این نقص‌ها بدون علامت‌اند و بعد از تولد که سنتز HbF کم می‌شود، علامت‌دار می‌شوند (۸).



شکل ۳. نمودار درصد سنتز هموگلوبین جنینی و بالغ بر اساس زمان پس از تولد (برگرفته از منبع ۸).

HSPCها از افراد سالم گرفته می‌شود و در معرض پالس‌های الکتریکی قرار می‌گیرد که منافذی در غشای آن‌ها ایجاد می‌کند. این منفذها به CRISPR–Cas9 اجازهٔ ورود به هسته سلول‌های بنیادی را می‌دهد تا جهش سلول‌های داسی را اصلاح کند (۳). سیستم Cas9 – gRNA از دو جزء اساسی؛ یعنی Guide RNA و پروتئین Cas9 تشکیل شده است. کمپلکس gRNA–Cas9 می‌تواند جهت ایجاد یک شکست دو رشته‌ای در ناحیه مشخصی از ژن هدف استفاده شود (۲).

تکنیک ویرایش ژن CRISPR–Cas9، لوکوس BCL11A را هدف قرار می‌دهد و به این ترتیب بیان BCL11A کاهش می‌یابد. هدف این شکل از درمان با ویرایش ژنوم، اصلاح جهش در سلول‌های بنیادی به میزان کافی است تا خون در حال گردش، گلبول‌های قرمز را اصلاح کند. در آخر بیماران این سلول‌های ویرایش شده را دریافت می‌کنند و در نتیجه HbF آن‌ها به مقدار زیادی افزایش پیدا می‌کند (۸).



شکل ۴. تصویری شماتیک از کمپلکس Cas9–gRNA در حال سرکوب خاموش‌کنندهٔ ژن هموگلوبین جنینی (برگرفته از منبع ۸).

در آینده سلول‌های بیمارانی که در کارآزمایی شرکت خواهند کرد، به محل اجرای تکنیک CRISPR فرستاده می‌شوند تا تحت ویرایش ژنتیکی قرار بگیرند. سپس قبل از اینکه سلول‌های بنیادی ویرایش شده دوباره وارد جریان خون بیماران شوند، شیمی‌درمانی[11] را دریافت می‌کنند (۳).

یکی از محققان مطالعه در این زمینه می‌گوید: «در حال حاضر، ما در حال انجام روشی از درمان هستیم که سلول‌ها از مغز استخوان خارج شوند تا جهش در خارج از بدن[12] اصلاح گردد؛ اما در طول این زمان که می‌تواند ماه‌ها طول بکشد مغز استخوان دوباره پر می‌شود؛ در نتیجه هنگامی که وقت آن برسد تا سلول‌های اصلاح‌شده را وارد کنیم، بیمار باید تحت شیمی‌درمانی قرار بگیرد تا مغز استخوان را خالی کند و به سلول‌های اصلاح‌شده اجازه دهد تا به محل اصلی خود بازگردند.»

لازم به ذکر است دانشمندان در تلاش هستند که این تکنیک را بهبود ببخشند تا اصلاح جهش سلولی بدون برداشت سلول‌های بنیادی از مغز استخوان انجام گیرد و سیستم ایمنی پس از برداشت سلول‌ها تضعیف نشود. در هر حال استفاده از فناوری CRISPR چه به‌صورت in vivo و چه به‌صورت in vitro استراتژی موفقیت‌آمیزی برای بیماری کم‌خونی داسی شکل است (۱۰).

۱۱ Chemotherapy
۱۲ ex vivo therapy

درست است که اهدای سلول‌های بنیادی سازگار با میزبان هنوز هم درمان خط اول است، اما پیدا کردن اهداکننده همچنان چالش برانگیز است. مزیت رویکرد جدید این است که از سلول‌های خودِ بیمار (سلول‌های بنیادی اتولوگ[13]) بدون نیاز به یک اهداکننده استفاده می‌کنند با این روش می‌توان سلول‌های خود بیمار را دستکاری کرد، بدون آنکه نگران رد پیوند یا واکنش‌های ایمنی بدن میزبان بود همچنین این روش مانند دیگر مطالعات ژن‌درمانی از وکتور ویروسی استفاده نمی‌کند؛ بلکه با الکتروپوراسیون[14] (ایجاد سریع منفذ در سلول با استفاده از ولتاژ بالا) انجام می‌شود این روش به پایین بودن ریسک فعال شدن ژن در خارج از سلول هدف معروف است. استفاده از چنین روش ویرایش ژنی، این پتانسیل را دارد که بر همهٔ مسائل غلبه کند امیدواریم که این درمان در کشورهای کم‌درآمد نیز در دسترس و مقرون‌به‌صرفه باشد و تأثیر مهمی در سلامت جامعه بیماران این مناطق داشته باشد (۳).

۱۳ Autologous stem cells
۱۴ Electroporation

یک‌قدم با پارکینسون؛ تکنولوژی ارگانوئید

(استفاده از فناوری ارگانوئید برای مدل‌سازی بیماری پارکینسون)

مهدیه سپهری

دانشجوی کارشناسی

بیوتکنولوژی دانشگاه الزهرا تهران

بیماری پارکینسون[1] (PD) یک بیماری شایع عصبی است که با از دست دادن پیش‌رونده عملکرد حرکتی مشخص می‌شود و ۱ تا ۲ نفر از هر ۱۰۰۰ نفر را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

به‌طور عمده این بیماری در اواخر دوران زندگی رخ می‌دهد و فاقد نشانگر زیستی[2] قطعی برای تشخیص زودهنگام است (۱).

در مواقع بسیار نادر ممکن است علائم پارکینسونی در افراد زیر ۲۰ سال نیز ظاهر شود (۲). در جمعیت سال‌خورده، PD دومین بیماری متداول نورودژنراتیو[3] (تخریب‌کنندهٔ عصب) پس از بیماری آلزایمر است. اگرچه تاکنون نتایج مهمی در تحقیقات PD به‌دست آمده است، اما همچنان درمان قطعی آن یک معما است (۳).

این بیماری با از دست دادن تدریجی گروه خاصی از سلول‌های عصبی سنتزکنندهٔ دوپامین؛ یعنی نورون‌های دوپامینرژیک[4] A9 در توده سیاه[5] همراه است که منجر به عدم ترشح دوپامین و اختلال در تنظیم کنترل حرکت در عقده‌های قاعده‌ای[6] می‌شود. در نهایت مرگ نورون‌های دوپامینرژیک[7] رخ می‌دهد. از نظر بالینی مرگ نورون‌های دوپامینرژیک منجر به بروز علائم پارکینسونی از جمله برادی‌کینزی[8] (کندی حرکت)، سفتی عضلانی، لرزش غیرارادی و از نظر پاتولوژیک باعث ایجاد رسوبات پروتئینی به نام اجسام لویی[9] متشکل از پروتئین آلفا-سینوکلئین[10] می‌شود. در واقع PD یک بیماری چندوجهی است که از نظر بالینی خود را با درجه‌های مختلف نشان می‌دهد. نزدیک به ۱۰ درصد مواقع، PD مربوط به جهش ژنتیکی ارثی است در حالی که در مواقع دیگر علت نامشخصی

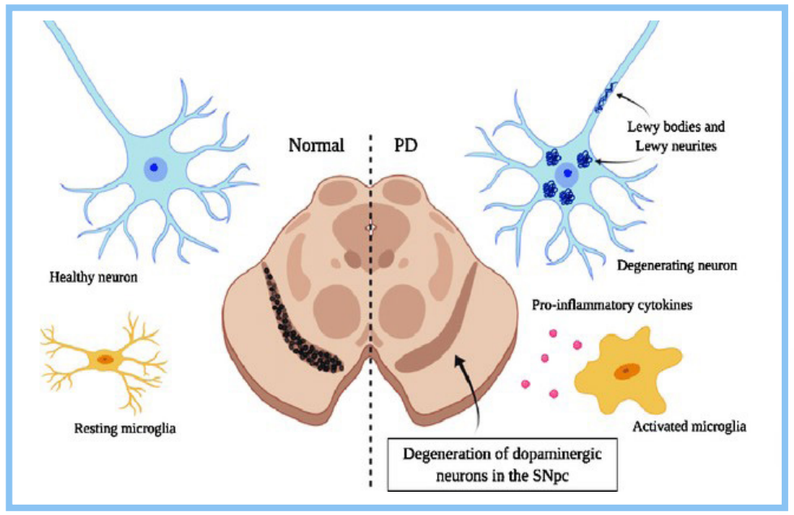
۱ Parkinson's Disease
۲ Biomarker
۳ Neurodegenerative Disease (NDD)
۴ گروه A9 متراکم‌ترین گروه سلول‌های دوپامینرژیک است و در بخش ونترولترال مغز میانی قرار دارد.
۵ توده سیاه یا **Substantia Nigra** یک بخش از ساختار عقده‌های قاعده‌ای است که در مغز میانی قرار دارد. نورون‌های دوپامینرژیک موجود در توده سیاه، سطوح بالایی از نورومالنین را بیان می‌کنند. از بین رفتن این نورون‌ها، عامل اصلی بیماری پارکینسون است.
۶ عقده‌های قاعده‌ای یا **Basal Ganglion** یک ناحیه زیر قشری متشکل از پنج هسته، از جمله توده سیاه است. این ساختار نقش مهمی در تنظیم سیستم حرکتی دارد.
۷ Dopaminergic
۸ Bradykinesia
۹ Lewy bodies
۱۰ Alpha-synuclein

● مدل‌سازی بیماری‌ها با ارگانوئید

پیشرفت‌ها در کشت سلول‌های بنیادی، امکان مشتق‌شدن بافت‌های سه‌بعدی آزمایشگاهی به نام ارگانوئیدها را فراهم کرده است که برخی از مشخصه‌های کلیدی اندام‌های واقعی مثل چند سلولی و عملکردی بودن را در مقیاس میکرومتر تا میلی‌متر نشان می‌دهند (۱). ظهور فناوری کشت سه‌بعدی ارگانوئید در طول دهه گذشته، محبوبیت بسیاری در بین محققان پیدا کرده است (۳)؛ چراکه کشت های سلولی ابزارهای تحقیقاتی حیاتی برای مدل‌سازی هستند. استفاده از فناوری ارگانوئید، محققان را قادر می‌سازد تا اندام‌های انسان را در یک پلیت بازسازی کنند (۶, ۷). سلول‌های پستانداران ذاتاً دارای توانایی خودسازمان‌دهی[12] هستند و از این توانایی برای توسعهٔ کشت‌های سه‌بعدی از بافت‌های اولیه استفاده می‌شود (۸).

دارد. در سطح سلولی، PD با نقص در مسیرهای متعدد از جمله ناهنجاری در عملکرد میتوکندری و لیزوزومی، تجمع پروتئین، اختلال عملکرد سیناپسی و آکسون و افزایش استرس اکسیداتیو مرتبط است (۴, ۵).

مدل‌سازی PD به محققان فرصتی برای یافتن راهکارهای بهتری برای تشخیص، درمان یا پیشگیری از آن می‌دهد. از همین جهت در این مقاله، به توضیح استفاده از مدل‌های سه‌بعدی ارگانوئید[11] مغز و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی می‌پردازیم.



شکل ۱. مقایسهٔ نورون‌های توده سیاه در مغز افراد سالم (چپ) با بیماران PD (راست) (۴).

۱۱ Organoid
۱۲ Self- regeneration

در واقع پیشرفت‌های اخیر در فناوری کشت سه‌بعدی، به سلول‌های بنیادی اجازه می‌دهد تا ویژگی مطلوب خود سازمان‌دهی را نشان دهند.

ارگانوئیدهای به‌دست آمده منعکس‌کنندهٔ ویژگی‌های ساختاری و عملکردی کلیدی اندام‌هایی مانند کلیه، ریه، روده، مغز و شبکیه و... هستند؛ بنابراین می‌توان از فناوری ارگانوئید برای مدل‌سازی رشد اندام‌های انسان و آسیب‌شناسی‌های مختلف انسانی در یک پلیت استفاده کرد. علاوه بر این، ارگانوئیدهای مشتق‌شده از بیمار برای پیش‌بینی پاسخ دارویی به‌صورت پزشکی شخصی کاربرد دارند. ارگانوئیدها ابزار جدیدی برای پزشکی بازساختی هستند و در ترکیب با فناوری ویرایش، به‌منظور ژن‌درمانی استفاده می‌شوند. بسیاری از کاربردهای بالقوهٔ این فناوری نوین، همچنان در حال بررسی هستند (۹).

ارگانوئیدها را می‌توان از دو نوع اصلی سلول‌های بنیادی ایجاد کرد:

(۱) سلول‌های بنیادی بزرگ‌سالان[۱۳] (ASCs)

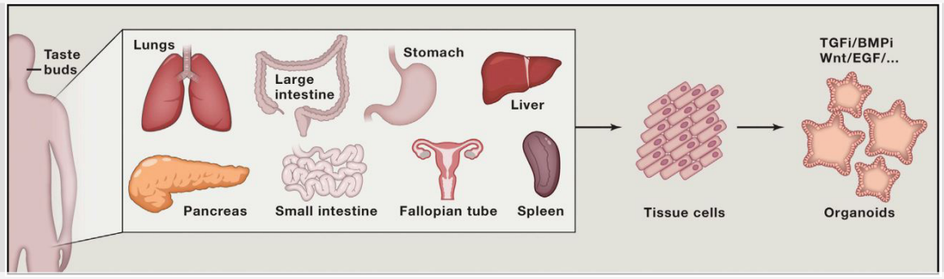
(۲) سلول‌های بنیادی پرتوان؛ یعنی سلول‌های بنیادی جنینی[۱۴] (ESCs) و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی[۱۵] (iPSCs)

هر دو گروه سلول‌های بنیادی از پتانسیل تکثیر و گسترش نامحدود در کشت برخوردارند. این پتانسیل برای سلول‌های ESC و iPSC که به‌طور کلی سلول‌های بنیادی پرتوان[۱۶] یا PSC نامیده می‌شوند، یک پیش‌نیاز ضروری برای کشف آن‌ها بوده است. در مقابل، مدت‌ها تصور می‌شد که ASCها به استثنای سلول پوست، قادر به تکثیر زیاد در خارج از بدن نیستند (۹).

۱۳ Adult Stem Cells
۱۴ Embryonic Stem Cells
۱۵ Induced Pluripotent Stem Cells
۱۶ Pluripotent Stem Cells

ارگانوئیدهای مشتق‌شده از سلول‌های بنیادی بزرگ‌سالان

در حالی که ارگانوئیدهای مبتنی بر PSC فرآیندهای رشدی را برای استقرار خود به کار می‌برند، می‌توان با ایجاد شرایط خاصی ASCها را مجبور به تشکیل ارگانوئیدها کرد، به‌گونه‌ای که خود نوسازی[۱۷] بافت فیزیولوژیکی یا ترمیم بافت آسیب‌دیده را تقلید کنند. از آنجایی که ارگانوئید برخلاف رده سلولی (به‌طور ایدئال) تمام اجزای سلولی یک اندام معین را نشان می‌دهد، از نظر تئوری برای مطالعات بیماری‌های عفونی (به‌ویژه پاتوژن‌هایی انسانی و وابسته به انواع سلول‌های تخصصی) مناسب است (۹).

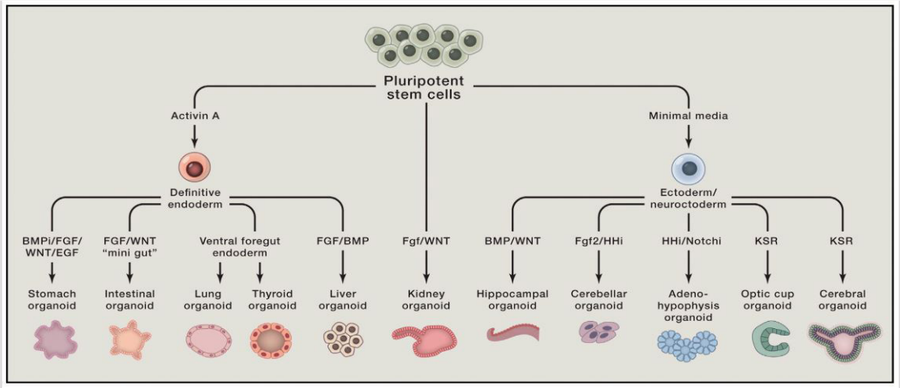


شکل ۲. تصویر شماتیک قسمت‌های مختلف بدن که می‌توانند به‌عنوان ارگانوئیدهای مشتق از ASCها کشت داده شوند (۹).

ارگانوئیدهای مشتق‌شده از سلول‌های بنیادی پرتوان

از زمانی که رده‌های سلولی پرتوان؛ یعنی ES و iPSC شناخته شدند، دانشمندان بینش‌هایی را از زیست‌شناسی تکاملی برای استخراج انواع سلول‌های متمایز از این سلول‌های بنیادی به کار گرفتند. Yoshiki Sasai و همکارانش اولین کسانی بودند که با پرسش یک سؤال قدمی فراتر نهادند؛ «آیا چنین سیستمی در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند برخی از سیستم‌های تنظیمی قوی ارگانوژنز را نه تنها از نظر تمایز سلولی، بلکه از نظر الگوهای فضایی و مورفوژنز خلاصه کند یا خیر؟»

آن‌ها در ادامه روش‌هایی را برای ایجاد ساختارهای مغز، شبکیه چشم و هیپوفیز در یک پلیت ابداع کردند (۹).

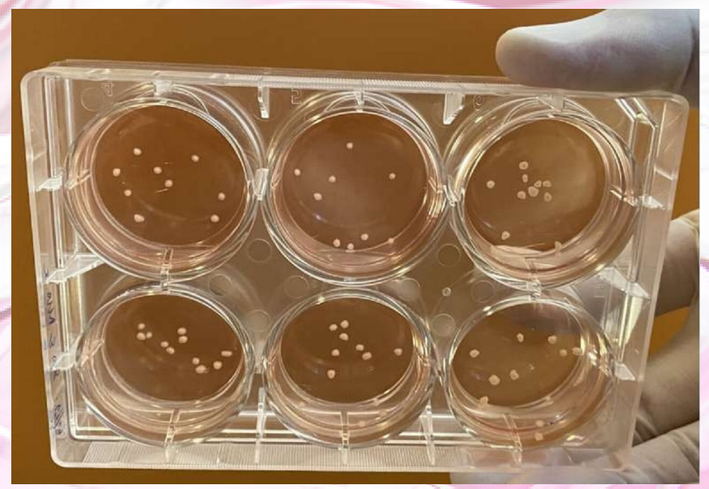


شکل ۳. تصویر شماتیک ارگانوئیدهای مختلف کشت‌پذیر از PSCها و سیگنال‌های رشدی که به کار می‌روند (۹).

۱۷ Self -renewal

• ارگانوئیدهای مشتق‌شده از سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (iPSCs)

کشف چهار فاکتور رونویسی در سال ۲۰۰۶ (Sox2، Oct3/4، c-myc و Klf4) نشان‌دهندهٔ تمایز سلول‌های بنیادی پرتوان از فیبروبلاست‌های موش بود؛ سپس شناسایی این فاکتورها در سلول‌های سوماتیک انسان نیز تکرار شد. تلاش‌های تحقیقاتی کنونی پروتکل‌هایی را برای iPSCها از فیبروبلاست‌های پوستی، سلول‌های بنیادی خون‌ساز، سلول‌های چربی و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی[۱۸] شناسایی کرده‌اند. این یافته‌ها زمینه را برای پیشرفت‌های جدید در رده‌های سلولی خاص بیمار فراهم کرده و ما را برای استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی که با نگرانی‌های اخلاقی همراه هستند، بی‌نیاز کرده است. علاوه بر این، پرتوانی اکنون به محققان اجازه می‌دهد تا سلول‌های بنیادی را به‌طور انتخابی به هر نوع سلول سوماتیکی تمایز دهند و در نتیجه بافت‌های مرتبط با بیماری را برای مطالعه تولید کنند. iPSCها یک استراتژی برای مدل‌سازی بیماری با استفاده از رده‌های سلولی خاص بیمار هستند و پس‌زمینه‌های ژنتیکی مرتبط با بیماری ارائه می‌دهند؛ بنابراین فرصت‌های جدیدی در توسعه درمانی و برنامه‌های غربالگری دارو ایجاد می‌کنند (۵).



شکل ۴. مغزهای کوچک آزمایشگاهی که بیماری پارکینسون را مدل‌سازی می‌کنند (منبع: Hyunsoo Shawn Je، دانشکده پزشکی Duke-NUS).

• نورون‌های مشتق‌شده از iPSCs

به‌علت عدم دسترسی به بافت‌های عصبی انسان و تفاوت‌های اصلی در مدل‌های حیوانی با آسیب‌شناسی‌های انسانی، iPSCها روش‌های جدیدی را برای مدل‌سازی آسیب‌شناسی بیماری‌های نورودژنراتیو متعدد از جمله آلزایمر، پارکینسون، اسکلروز جانبی آمیوتروفیک[۱۹] و بیماری هانتینگتون ارائه می‌کنند. شناسایی روش‌هایی برای تمایز دادن سلول‌ها به انواع سلول‌های عصبی توسط آنتاگونیست[۲۰]های TGFβ[۲۱]، محققان را به توسعه پروتکل‌ها برای تمایز iPSCها به زیرگروه‌های عصبی مختلف (نورون‌های قشری، کولینرژیک[۲۲]، دوپامینرژیک[۲۳]، GABAergic، هیپوکامپ، هیپوتالاموس، سروتونرژیک[۲۴] و پورکنژ[۲۵]) و همچنین سلول‌های عقده‌ای (آستروسیت‌ها[۲۶] و الیگودندروسیت‌ها[۲۷]) سوق داده است. پروتکل‌های تمایز iPSCها بهینه شده‌اند؛ مثلا برای تمایز دادن سلول‌ها به نورون‌های دوپامینرژیک بیماران PD از پروتکل‌های خاصی (مسیرهای سیگنال دهی و نگهداری در ترکیبات مختلف) استفاده می‌شود (۵).

• ارگانوئیدهای عصبی مشتق‌شده از iPSCs

ارگانوئیدها از سلول‌های بنیادی در یک ماتریکس سه‌بعدی مانند ماتریژل یا هیدروژل‌های مشتق‌شده از حیوانات به‌دست می‌آیند که امکان رشد و تمایز کارآمد سلول را فراهم می‌کند. رشد موفق ارگانوئیدها، بیشتر به توانایی ذاتی سلول‌های بنیادی برای خود سازمان‌دهی، تشکیل ساختارهای منظم، برهمکنش‌های سلول-سلول آن‌ها و توانایی تمایز به جمعیت‌های سلولی متنوع بستگی دارد. ارگانوئیدها برای مدل‌سازی سیستم‌هایی از کلیه، کبد، روده، قسمت‌های بینایی مغز و مغز میانی استفاده شده‌اند که منعکس‌کنندهٔ پرتوانی iPSCها هستند. ارگانوئیدها به یک ابزار حیاتی در مدل‌سازی بیماری از مراحل اولیه تبدیل شده‌اند و همچنین قادر به ارائه مدل‌های در دسترس هستند که می‌توانند فنوتیپ‌های بیماری را تکرار کنند. مدل‌سازی برای هر بیماری به‌طور اختصاصی انجام می‌شود؛ یعنی ارگانوئیدهای مغزی برای مدل‌سازی میکروسفالی استفاده شده‌اند، در حالی که ارگانوئیدهای مغز میانی برای مدل‌سازی PD استفاده شده‌اند (۵).

---

۱۸ سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی یا Peripheral Blood Mononuclear Cell سلول‌هایی خونی هستند که از سلول‌های بنیادی خون‌ساز مغز استخوان نشأت می‌گیرند و جمعیت ناهمگنی (لنفوسیت، سلول‌های دندریتی و مونوسیت‌ها) را شامل می‌شوند.

۱۹ Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)

۲۰ آنتاگونیست (Antagonist) ساختار بیولوژیکی یا عامل شیمیایی است که اثر ماده دیگری را متوقف می‌کند.

۲۱ فاکتور رشد تغییر دهنده بتا یا Transforming Growth Factor Beta، نوعی سیتوکینین است که در سیگنال‌دهی سلولی نقش دارد و در بسیاری از بافت‌های بدن همچون مغز بیان می‌شود.

۲۲ نورون‌های کولینرژیک (Cholinergic) به‌طور عمده از انتقال‌دهندهٔ عصبی استیل‌کولین برای ارسال پیام‌های خود استفاده می‌کنند.

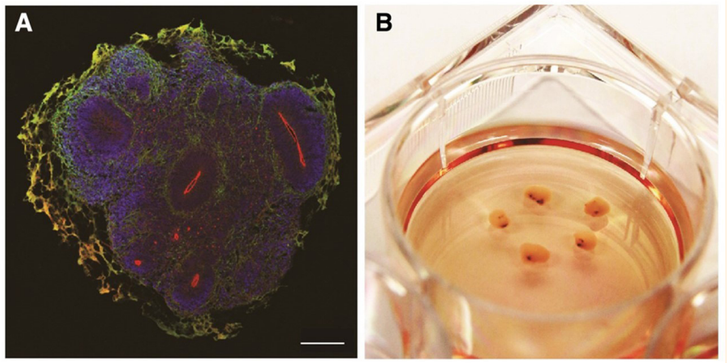
۲۳ نورون‌های GABAergic، گاما آمینوبوتیریک‌اسید (GAMA) تولید می‌کنند که یک انتقال‌دهندهٔ عصبی مهارکننده در پستانداران محسوب می‌شود.

۲۴ نورون‌های سروتونرژنیک (Serotonergic) منبعی از انتقال‌دهندهٔ عصبی سروتونین هستند. این نورون‌ها در چرخه‌های خواب و بیداری نقش دارند.

۲۵ نورون‌های پورکنژ (Purkinje neuron) دسته‌ای از نورون‌های GABAergic هستند که درون مخچه قرار دارند. این سلول‌ها در تنظیم عملکرد حرکتی و تعادلی نقش دارند.

۲۶ آستروسیت (Astrocyte) سلول ستاره‌ای شکلی است که حفاظت و تغذیهٔ سلول‌های عصبی را بر عهده دارد.

۲۷ الیگودندروسیت (Oligodendrocyte) سلول تولیدکنندهٔ میلین در دستگاه عصبی مرکزی است.



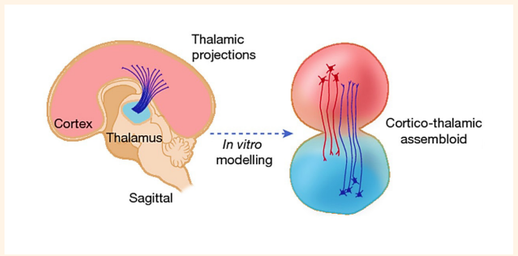
شکل ۵. مدلی از ارگانوئیدهای مغز میانی ۳۵ روزهٔ انسان. نشانه‌گذاری سمت رأسی با ترکیبات خاصی به رنگ قرمز و نشانه‌گذاری سلول‌های عصبی به رنگ سبز (A) و کشت طولانی‌مدت ارگانوئید، تجمع نوروملانین و در نتیجه ایجاد لکه‌های سیاه (B) (۱۰).

ارگانوئیدهای سه‌بعدی مغز، پتانسیل مدل‌سازی مدارهای پیچیده را با تولید ساختارهای سه‌بعدی به نام اسمبلوئیدها[۲۸](مجموعه‌های ارگانوئیدهای مختلف مناطق خاص) برای درک بهتر ما از مغز انسان فراهم می‌کنند. این موضوع در مطالعات اخیر نشان داده شده است که مهاجرت سلولی و مدارهای عصبی را در شرایط آزمایشگاهی بررسی می‌کند؛ همانند مهاجرت نورون‌های GABAergic از جلوی پیش مغز به پشت آن و اسمبلوئیدهای کورتیکو-تالامیک[۲۹] که دسته‌هایی از الیاف آکسون بین نورون‌های قشری و نورون‌های تالاموس را نشان می‌دهند. شایان ذکر است، چنین ارگانوئیدهایی ممکن است به‌صورت اندام تراشه[۳]، برای استفاده از نورون‌های مشتق‌شده از iPSC بیمار، به‌عنوان جایگزینی برای مدل‌های پیش بالینی مرسوم برای غربالگری داروها استفاده شوند (۵).

ارگانوئیدهای خاص ناحیه مغز، دارایی ارزشمندی برای مطالعه پاتولوژی بیماری‌ها هستند و پتانسیل زیادی برای غربالگری داروها را ارائه می‌دهند. برای مثال یکی از مطالعات انجام‌شده نشان داده است که آنتی‌اکسیدان‌های میتوکندریایی همانند NAC[۳۱]، باعث کاهش تجمع آلفا-سینوکلئین در نورون‌ها می‌شود (۵).

با توجه به اینکه در بیماری PD از نظر ژنتیکی چندین ژن با اشکال خانوادگی غالب یا مغلوب از جمله، SCNA، LRRK2، PINK1، PARK2(parkin) و GBA1 و همچنین ژن‌هایی مانند DJ-1، PARK9 (ATP13A2)، SJ-1 و VPS35 مرتبط هستند؛ بنابراین نورون‌ها و ارگانوئیدهای

۲۸ Assembloid
۲۹ Cortico-talamic Assembloids
۳۰ Organ-on-a-chip
۳۱ N-Acetyl cysteine



مشتق‌شده از iPSC که از بیماران مبتلابه PD حاوی جهش در این ژن‌ها و همچنین از بیماران مبتلابه PD ایدیوپاتیک (دارای علت نامشخص) به‌دست آمده‌اند، امکان ایجاد مدل‌های جدیدی را برای درک آسیب‌شناسی PD و آزمایش‌های درمانی فراهم کرده‌اند (۵).

شکل ۶. تصویر شماتیک اسمبلوئیدهای کورتیکو-تالامیک(۱۱).

چالش‌ها و فرصت‌ها

نورون‌ها و ارگانوئیدهای مشتق‌شده از iPSCهای بیماران PD، فنوتیپ‌های اصلی بیماری‌زایی را شبیه‌سازی می‌کنند و یک مدل مهم برای مطالعه و شناسایی مسیرهای عصبی درگیر در بیماری هستند. اهمیت موضوع اینجاست که پژوهشگران تاکنون از کشت‌های عصبی دوبعدی بهره می‌بردند، اما استفاده از ارگانوئیدهای سه‌بعدی مغز میانی برای بررسی آسیب‌شناسی و پیچیدگی عصبی که در مدل‌های دوبعدی منعکس نشده‌اند، مهم خواهد بود. این فناوری‌ها رویکردهای منحصربه‌فردی را به غربالگری داروها اضافه کرده‌اند و همچنین مدل‌های جدیدی را برای ارزیابی مجدد سیستم عصبی ارائه می‌کنند؛ بنابراین کشت‌های سلولی مشتق‌شده از بیمار نقش کلیدی در شناسایی مکانیسم‌های بیماری ایفا می‌کنند که می‌توانند اهداف درمانی برای بیماری‌های چندوجهی مانند باشند (۵). البته باید در نظر داشت که نسخه‌های فعلی ارگانوئیدها دارای محدودیت‌های واضحی هستند؛ به‌عنوان مثال رگ‌های خونی و سلول‌های ایمنی وجود ندارند، اما بااین‌حال پیش‌بینی می‌شود که ویژگی‌های خودسازمان‌دهی ارگانوئیدها ممکن است فراتر از مرزهای فعلی آن‌ها گسترش یابد و امکان ترکیب مناسب عناصر سلولی (یا میکروبی) اضافی را فراهم کند. در نهایت باید گفت که به‌علت سهولت تولید و شباهت نزدیک به اندام‌های انسان در سلامت و بیماری، ارگانوئیدها جذابیت زیادی برای تحقیقات نوین دارند و نتایج بسیار نویدبخش، همراه با کاربردی مؤثر به جامعهٔ پزشکی ارائه خواهند داد (۹).

تکمیل پروژۀ ژنوم انسان؛ دستاورد مهم قرن ۲۱

شایسته مقدم راد
دانشجوی کارشناسی بیوتکنولوژی دانشگاه الزهرا تهران

امروزه بسیاری از افراد می‌توانند به اطلاعات ژنومی خود دسترسی داشته باشند که این امر مدیون پروژۀ ژنوم انسان[۱] است.

این پروژه در اکتبر سال ۱۹۹۰ شروع شد و پیش‌نویس آن در فوریه ۲۰۰۱ منتشر گردید (۱). هدف این پروژه ایجاد یک منبع کامل از ژنوم انسان بود. این نسخه و همچنین نسخۀ نهایی که در سال ۲۰۰۳ منتشر شد، شامل صددرصد ژن‌ها نبود و حدود ۹۲درصد از کل توالی ژنوم انسان را پوشش می‌داد. در آن زمان فناوری‌های مناسبی برای رمزگشایی بخش‌های ناشناخته وجود نداشت، اما محققان می‌دانستند که ۸درصد باقی‌مانده، به‌احتمال زیاد حاوی اطلاعات مهمی در فرآیندهای بیولوژیکی است (۲).

در شروع پروژه ژنوم انسان، فناوری مربوط به توالی‌یابی DNA بسیار وقت‌گیر، خسته‌کننده و تا اندازه‌ای پرهزینه بود. تخمین زده شد که یک تکنسین با فناوری‌های معمولی توالی‌یابی (فناوری‌های دهۀ ۱۹۹۰) می‌تواند نزدیک به ۲۰۰۰ جفت باز را در روز توالی‌یابی کند؛ این در حالی است که هدف اصلی پروژه ژنوم انسان توالی‌یابی کل ۳ میلیارد جفت باز ژنوم انسان بوده است. فناوری‌های قدیمی‌تر توالی‌یابی DNA، توانایی خواندن توالی‌های کوتاه‌تر با دقت کمتر را داشتند (۳ , ۴).

از زمان انتشار اولیۀ نقشۀ ژنی، ژنوم مرجع انسان تنها بخش یوکروماتینه آن را پوشش داده بود و مناطق مهم هتروکروماتینه ناتمام باقی مانده بود. مناطق هتروکروماتینه، ناحیه‌هایی غنی از آدنین و تیمین هستند. در مقابل، ناحیه یوکروماتینه غنی از گوانین و سیتوزین است. مناطق یوکروماتنه از نظر رونویسی فعال‌ترند و برخلاف مناطق هتروکروماتینه که نوارهای تیره در G بندینگ[۲] تشکیل می‌دهند، به‌صورت نوارهای روشن‌تری ظاهر می‌شوند (۲).

توالی‌یابی بخش باقی‌مانده، توسط کنسرسیوم (Telomere to Telomere یا T2T) انجام شد و محققانی از مؤسسه ملی تحقیقات ژنوم انسانی[۳] این پروژه را هدایت کردند که نتایج تحقیقات آن‌ها در مجله Science منتشر شد. کنسرسیوم T2T با پرداختن به ۸درصد باقی‌مانده از ژنوم، یک توالی کامل شامل ۳/۰۵۵ میلیارد جفت بازی از ژنوم انسانی را ارائه داد (۵).

از آن زمان، محققان ابزارهای آزمایشگاهی و روش‌های محاسباتی بهتری را توسعه دادند. در طول دهۀ گذشته، دو فناوری جدید توالی‌یابی DNA ایجاد شدند که توانایی خواندن توالی‌های بسیار طولانی‌تری را دارند. این دو فناوری مربوط به توالی‌یابی Nanopore آکسفورد و توالی‌یابی DNA PacBio HiFi، هستند (۶).

شرکت Oxford Nanopore Technologies برای توالی‌یابی DNA از نانوحفره‌ها به‌عنوان حسگر زیستی کمک می‌گیرد. طبق تجهیزات تولیدی این شرکت، توالی‌یابی DNA از طریق سیستم‌های مختلفی (MinION، PromethION و GridION) قابل‌انجام است.

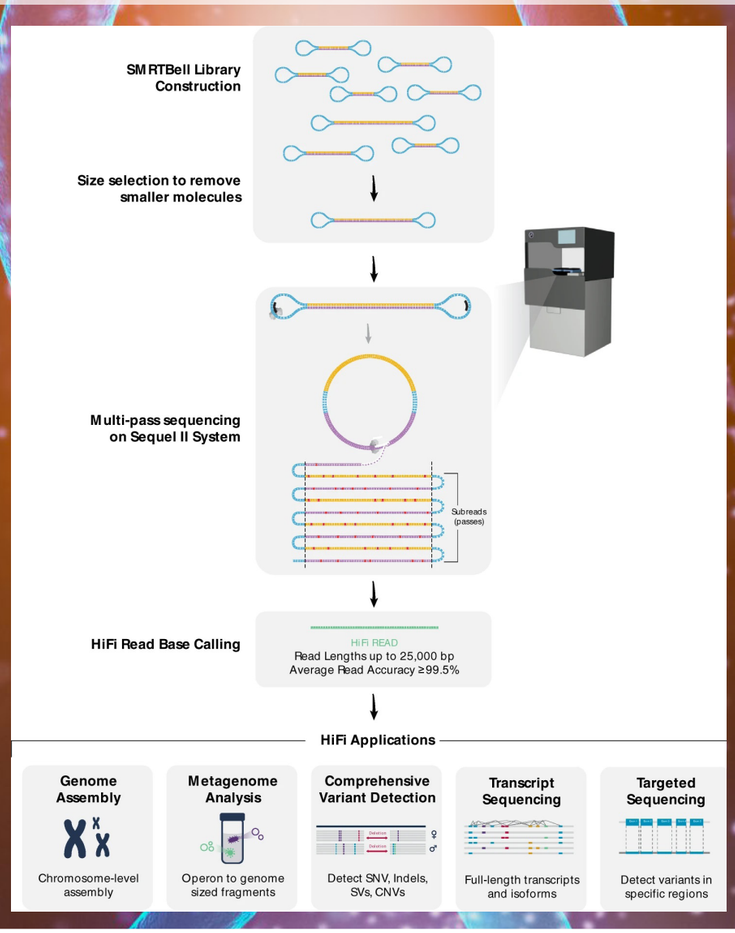
در این تکنیک‌ها پلیمر DNA تحت تأثیر اختلاف ولتاژ الکتریکی از میان نانوحفره عبور می‌کند و همراه با عبور DNA به‌صورت real time توالی‌یابی انجام می‌گیرد (۷). به کار انداختن جریان الکتریکی در این سیستم سبب هدایت یون‌ها از نانوحفره‌ها در جهت شیب غلظت می‌گردد. ورود مولکول DNA به نانوحفره در برابر جریان عبوری یون‌ها مقاومتی ایجاد می‌کند که منجر به تغییر شدت جریان عبوری از منافذ می‌گردد. این تغییر شدت جریان برای هر یک از انواع نوکلئوتیدها برحسب اندازه و شکل فضایی متفاوت است که توسط دستگاه Nanopore تشخیص داده می‌شود. با اندازه‌گیری این تغییرات امکان تعیین توالی DNA فراهم می‌گردد (۸).

بر مبنای گزارش شرکت می‌توان با استفاده از ۲۰ ابزار GridION به‌طور موازی، ژنوم انسان را در ۱۵ دقیقه و با هزینۀ کمتر از ۱۰ دلار به ازای هر گیگا باز آنالیز نمود (۷).

شکل ۱. دستگاه‌های مربوط به انواع سیستم‌های توالی‌یابی Oxford Nanopore Technology (a) و تصویر شماتیک اساس کار این سیستم‌ها (b) (منبع: برگرفته از سایت‌های Biomarker Technologies و Sience in School)

۱ Human Genome Project (HGP)
۲ G- banding
۳ National Human Genome Research Institute (NHGRI)

فناوری دیگر، مربوط به شرکت Pacific Bioscience می‌شود که بر اساس همانندسازی DNA طراحی شده است. تعیین توالی درون چاهک‌هایی انجام می‌شود که در کف این چاهک‌ها آنزیم DNA پلیمراز و رشته الگو تثبیت شده و سنتز DNA در این محل صورت می‌گیرد. واکنش پلیمریزاسیون با استفاده از نوکلئوتیدهایی که فسفات گامای هر یک با مواد فلورسانت نشانه‌گذاری شده انجام می‌شود (۸). در توالی‌یابی PacBio HiFi ژنوم به قطعاتی شکسته و به دو سمت آن آداپتور سنجاق سری متصل می‌شود. با اتصال پرایمر و DNA پلیمراز subreadها ایجاد شده و با آنالیزهای صورت گرفته طی مراحلی DNA حلقوی توالی‌یابی می‌شود (۹ , ۱۰). محققان کنسرسیوم T2T از هر دو فناوری توالی‌یابی DNA برای تهیه توالی کامل ژنوم انسانی استفاده کردند (۶).



شکل ۲. تصویر شماتیک، اساس کار توالی‌یابی HiFi و کاربردهای آن (۱۰)

در مجموع این پروژه جدید نزدیک به ۲۰۰ میلیون کد ژنتیکی (نوکلئوتید) را به نسخه قبلی اضافه کرد. این ۸درصد آخر ژنوم، شامل ژن‌های متعدد و همچنین توالی‌های تکراری DNA است که ممکن است بر عملکرد سلول‌ها تأثیر بگذارد. بیشتر توالی‌های تازه اضافه‌شده در سانترومرها (بخش میانی هر کروموزوم) و نزدیک تلومرها (انتهای تکراری هر کروموزوم) بودند. تلومرها از مناطق انتهایی DNA کروموزومی در برابر تخریب تدریجی محافظت می‌کنند (۶). تجزیه‌وتحلیل توالی کامل ژنوم به مقدار زیادی، دانش ما را در مورد کروموزوم‌ها افزایش می‌دهد. این نقشه کامل، کمک می‌کند تا به سؤالات اولیه و اساسی زیست‌شناسی در مورد نحوه جداسازی و چگونگی تقسیم صحیح کروموزوم‌ها پاسخ دهیم.

محققان توالی کامل ژنوم را با استفاده از یک رده سلولی انسانی، با تنها یک کپی از هر کروموزوم (هاپلوئید) تهیه کردند؛ برخلاف اکثر سلول‌های انسانی که دو نسخه از هر کروموزوم را حمل می‌کنند و دیپلوئید هستند (۵).

دکتر Evan Eichler، محقق دانشگاه واشنگتن و کنسرسیوم T2T می‌گوید: «از زمانی که اولین پیش‌نویس توالی ژنوم انسانی را داشتیم، تعیین توالی مناطق پیچیده ژنومی چالش برانگیز بود. این نقشهٔ کامل، طرز تفکرمان را دربارهٔ تنوع ژنومی، بیماری و تکامل انسان متحول خواهد کرد. تکمیل توالی ژنوم انسان، مانند گذاشتن یک عینک جدید بود. اکنون که می‌توانیم همه چیز را به‌وضوح ببینیم، یک‌قدم به درک معنای همه آن موارد گفته‌شده، نزدیک‌تر شده‌ایم.» (۵)

به‌طور کلی می‌توان گفت که تکمیل نقشه کامل ژنوم انسان، یک دستاورد علمی باورنکردنی است و داشتن یک توالی کامل و بدون شکاف[۴] از نزدیک به ۳ میلیارد باز در DNA انسان، برای درک تنوع ژنومی انسان و برای درک نقش ژنتیک در برخی بیماری‌ها ضروری است. در آینده، زمانی که یک فرد ژنوم خود را توالی‌یابی کند، پژوهشگران و پزشکان قادر خواهند بود DNA او را شناسایی کرده و از اطلاعات آن برای درمان مؤثرتر و خدمات درمانی بهتر، استفاده کنند.

۴ Gap free

رقابتی سرنوشت‌ساز در چشم

امیرعلی وزیری ● دانشجوی دکتری حرفه‌ای دامپزشکی دانشگاه آزاد واحد کرج

آنتی‌بادی‌ها[1] پروتئین‌های گردشی هستند که در پاسخ به‌مواجهه با ساختارهای بیگانه‌ای به نام آنتی‌ژن‌ها[2] در سرم مهره‌داران تولید می‌شوند و واسطه‌های ایمنی هومورال[3] در برابر همهٔ رده‌های میکروبی هستند.

آنتی‌ژن، یک مولکول، ساختار مولکولی یا هر ذرهٔ خارجی است که می‌تواند به یک آنتی‌بادی خاص متصل شود. آنتی‌بادی‌ها از نظر توانایی در تشخیص آنتی‌ژن‌ها بسیار متنوع و خاص هستند (۱ , ۲).

از آنجایی که این پروتئین‌ها، اولین بار به‌عنوان مولکول‌های سرمی کشف شدند که از بدن در برابر سم دیفتری محافظت می‌کردند، در ابتدا آن‌ها را آنتی‌توکسین می‌نامیدند؛ اما مدتی بعد کشف شد که پروتئین‌های مشابهی می‌توانند علیه بسیاری از مواد و نه فقط سموم میکروبی تولید شوند. پس از این کشف، نام عمومی آنتی‌بادی به آن‌ها داده شد.

یک انسان بالغِ سالم با وزن ۷۰ کیلوگرم هر روز حدود ۲ تا ۳ گرم آنتی‌بادی تولید می‌کند. نزدیک به دوسوم آنتی‌بادی‌های تولیدشده، نوعی آنتی‌بادی به نام IgA است که بیشترش توسط سلول‌های فعال‌شدهٔ B و سلول‌های پلاسمای موجود در دستگاه گوارش تولید می‌شود (۱).

● آنتی‌بادی‌ها چگونه عمل می‌کنند؟

مولکول‌های آنتی‌بادی، دو عملکرد اصلی در سیستم ایمنی انجام می‌دهند. اولین کار، شناسایی و اتصال به آنتی‌ژن است. این مسئله به‌طور کلی به معنای اتصال به ساختارهای مولکولی در سطح عوامل بیگانه (تعیین‌کننده‌های آنتی‌ژنی[4]) است که با ساختارهای مولکولی ساخته‌شده توسط سلول‌های میزبان تفاوت دارند. تعیین‌کننده‌های آنتی‌ژنی، معمولاً در کپی‌های متعدد در سطح عوامل بیگانه بیان می‌شوند؛ به‌عنوان مثال پروتئین‌ها یا کربوهیدرات‌هایی در سطح سلول باکتری یا پروتئین‌های پوششی که در سطح ویروس وجود دارند.

۱ Antibody

۲ Antigen

۳ Humoral immunity: ایمنی هومورال نوعی از دفاع اختصاصی است که در آن، آنتی‌بادی‌ها به‌عنوان ریزمولکول‌های واسطه، وارد عمل می‌شوند. این نوع از ایمنی به دلیل ماهیت آن که از طریق مایعات بدن انجام می‌گیرد، ایمنی هومورال، یا ایمنی مایعات بدن نام گرفته است (۱۸).

۴ Antigenic determinants

آنتی‌بادی‌های یک میزبان، می‌توانند طیف عظیمی از ساختارهای مولکولی را تشخیص دهند که به‌عنوان تنوع آنتی‌بادی توصیف می‌شود و برای پاسخ به تنوع ساختارهای مولکولی مرتبط با پاتوژن‌ها ضروری است (۳).

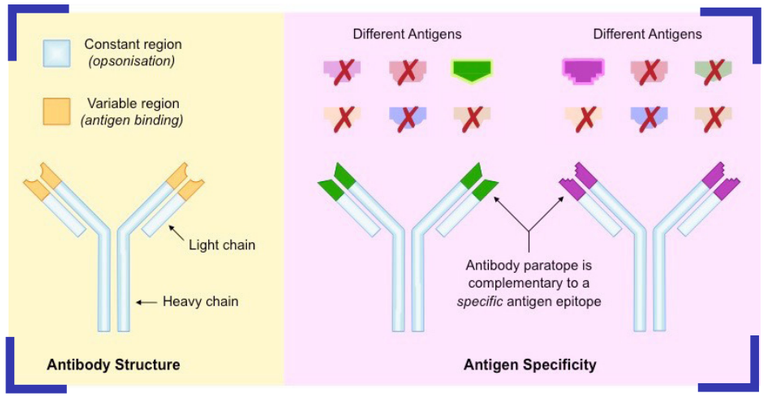
عمل سادهٔ اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن ممکن است برای غیرفعال کردن یک پاتوژن یا بی‌ضرر کردن یک سم کافی باشد؛ به‌عنوان مثال پوشانده شدن یک ویروس با آنتی‌بادی، می‌تواند از ورود آن به سلول‌های هدف جلوگیری کند و در نتیجه ویروس را خنثی کند.

بااین‌حال، در بسیاری از موارد عملکرد دوم مولکول آنتی‌بادی برای تحریک حذف مواد بیگانه اجرا می‌شود. این عملکرد شامل اتصال مولکول‌های خاص به نام مولکول‌های عامل، به مواد بیگانه پوشیده شده با آنتی‌بادی، برای ایجاد مکانیسم‌های حذفی پیچیده است.

به عبارتی ابتدا آنتی‌بادی به آنتی‌ژن بیگانه متصل می‌شود و سپس یک مولکول عامل به آنتی‌بادی اتصال می‌یابد. مکانیسم‌های حذفی شامل سیستم مکمل پروتئین‌ها، فاگوسیتوز توسط سلول‌های ایمنی میزبان (مانند نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها) و سمیت سلولی وابسته به آنتی‌بادی[5] توسط سلول‌های NK[6] هستند (۳).

خصوصیاتی که دو عملکرد اشاره‌شده بر مولکول آنتی‌بادی تحمیل می‌کنند، متضاد به نظر می‌رسند. اولین عملکرد به تنوع زیادی از آنتی‌بادی‌ها نیاز دارد و عملکرد دوم مستلزم آن است که مولکول‌های آنتی‌بادی مختلف، دارای ویژگی‌های مشترک باشند.

در واقع، اگر این ویژگی‌های مشترک نبود، می‌بایست برای حذف هر نوع آنتی‌ژن متصل به یک آنتی‌بادی، راه‌حل متفاوتی توسط سیستم ایمنی ایجاد می‌شد. این خصوصیات به‌ظاهر متناقض توسط ساختار خاص آنتی‌بادی برآورده می‌شوند که در شکل ۱ نشان داده شده است (۳).



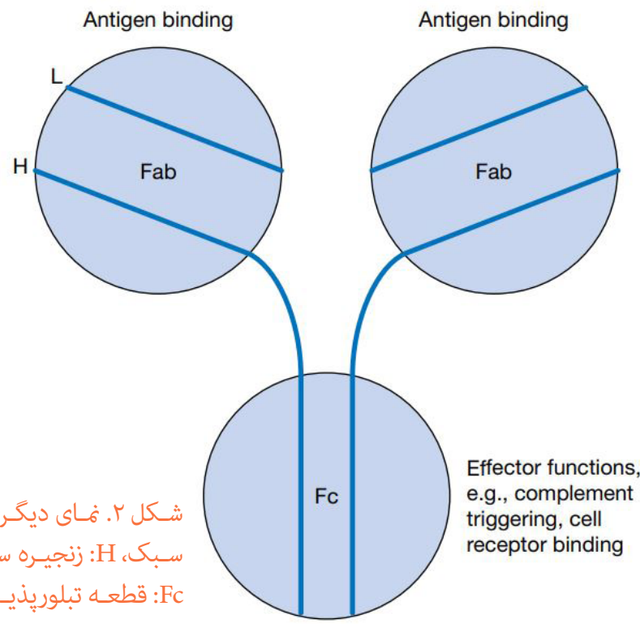
شکل ۱. تصویر شماتیک خصوصیات مشترک آنتی‌بادی‌ها (چپ) و خصوصیت منحصربه‌فرد آن‌ها (راست) (۴)

۵ Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)

۶ Natural killer cell: سلول‌های کشنده طبیعی، نوعی لنفوسیت هستند.

• ساختار آنتی‌بادی‌ها

آنتی‌بادی از سه واحد تشکیل شده است. دو واحد از آن‌ها با یکدیگر یکسان هستند و در اتصال به آنتی‌ژن نقش دارند. این دو واحد، قطعه اتصال به آنتی‌ژن یا همان بازوهای Fab[۷] مولکول آنتی‌بادی هستند. این واحدها شامل مناطقی از توالی آنتی‌بادی هستند که از یک آنتی‌بادی به آنتی‌بادی دیگر بسیار متفاوت است و به هر آنتی‌بادی خاص ویژگی اتصال منحصربه فرد آن را می‌دهد. حضور دو بازوی Fab یکسان باعث افزایش احتمال اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن می‌شود. واحد سوم، Fc[۸] (قطعه تبلورپذیر) است که در اتصال به مولکول‌های عامل نقش دارد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده، مولکول آنتی‌بادی دارای یک ساختار چهار زنجیره‌ای است که از دو زنجیرهٔ سنگین یکسان (Fab و Fc) و دو زنجیرهٔ سبک یکسان (Fab) تشکیل می‌شود (۳).



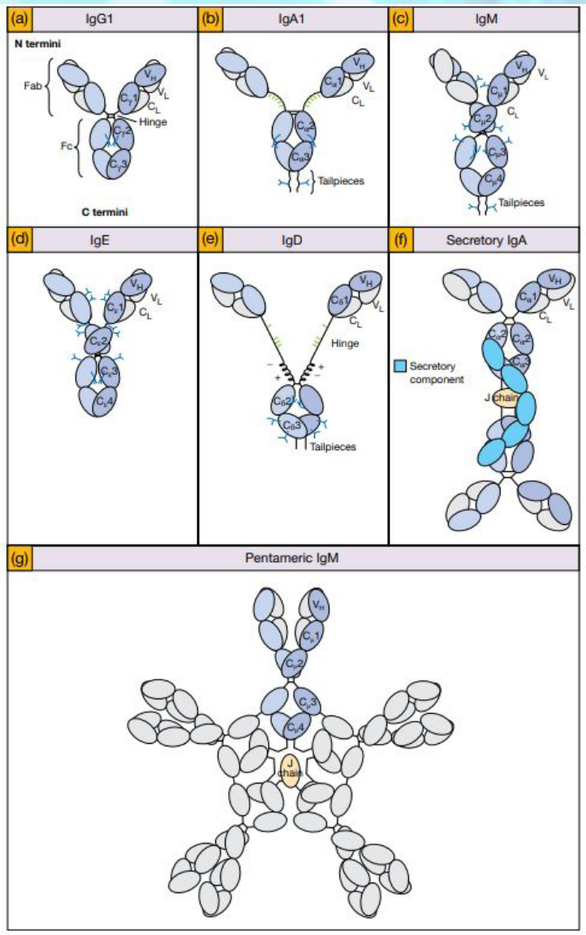
شکل ۲. نمای دیگری از آنتی‌ژن که نشان‌دهندهٔ L: زنجیره سبک، H: زنجیره سنگین، Fab: قطعه اتصال به آنتی‌ژن و Fc: قطعه تبلورپذیر است (۳).

• دسته‌بندی آنتی‌بادی‌ها

آنتی‌بادی‌ها اغلب به‌عنوان ایمونوگلوبولین‌ها[۹] شناخته می‌شوند پنج دسته از آنتی‌بادی‌ها یا ایمونوگلوبولین‌ها وجود دارد که به آن‌ها ایمونوگلوبولین G یا IgG، ایمونوگلوبولین M یا IgM، ایمونوگلوبولین A یا IgA، ایمونوگلوبولین D یا IgD و ایمونوگلوبولین E یا IgE گفته می‌شود. همه این کلاس‌ها، دارای ساختار چهار زنجیره‌ای هستند، اما در زنجیره‌های سنگین خود که به ترتیب $\gamma, \mu, \alpha, \delta$ و ε نامیده می‌شوند، متفاوت هستند. تفاوت انواع آنتی‌بادی‌ها در مناطق Fc آشکارتر است.

اتصال مولکول‌های عامل متفاوت به Fc منجر به تحریک عملکردهای مؤثر در هنگام اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن می‌شود؛ به‌عنوان مثال شناسایی آنتی‌ژن توسط IgM، ممکن است منجر به فعال شدن سیستم مکمل شود، در حالی که شناسایی توسط IgE حتی برای همان آنتی‌ژن ممکن است منجر به دگرانولاسیون ماست‌سل[۱۰] و آنافیلاکسی (افزایش نفوذپذیری عروق و انقباض عضلات صاف) شود. از تفاوت‌های ساختاری ایمونوگلوبین‌ها، حالت پلیمریزاسیون واحد مونومر آن‌هاست. واحد مونومر هر آنتی‌ژن در شکل ۱ نشان داده شده است. بر این اساس IgG و IgE به‌طور کلی مونومر هستند، در حالی که IgM به‌عنوان یک پنتامر (پنج مونومر متصل‌به‌هم) وجود دارد.

IgA در سرم عمدتاً به‌عنوان یک مونومر و در ترشحات سروموکوسی[۱۱] به‌عنوان یک دایمر (دو مونومر متصل‌به‌هم) وجود دارد. در شکل ۳ این ایمونوگلوبین‌ها مشخص شده‌اند (۳).



شکل ۳. انواع ایمونوگلوبولین‌ها به همراه ساختارشان (۳)

۷ Fragment antigen binding
۸ Fragment crystallizable
۹ Immunoglobulin

۱۰ Mast cell degranulation
۱۱ ترشحات سرمی و موکوسی

• تعامل آنتی‌ژن و آنتی‌بادی

تعامل یا واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی، یک برهمکنش شیمیایی خاص بین آنتی‌بادی‌های تولیدشده توسط سلول‌های لنفوسیت B و آنتی‌ژن‌ها طی واکنش ایمنی است. آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌ها با فرآیندی به نام آگلوتیناسیون[۱۲] ترکیب می‌شوند (۵). از آنجایی که بیشتر آنتی‌ژن‌ها بسیار پیچیده هستند، اپیتوپ های متعددی را ارائه می‌دهند که هر کدام از این اپیتوپ[۱۳]ها توسط تعداد زیادی لنفوسیت مختلف شناسایی می‌شوند. هر لنفوسیت برای تکثیر و تمایز به سلول‌های پلاسما فعال می‌شود و پاسخ آنتی‌بادی حاصل پلی‌کلونال[۱۴] (PAb) نام دارد.

به عبارتی یک آنتی‌ژن خاص می‌تواند توسط چندین آنتی‌بادی متفاوت و در نتیجه چندین نوع سلول لنفوسیت B شناسایی شود. در مقابل، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال[۱۵] (MAb) آنتی‌بادی‌هایی هستند که توسط یک نوع لنفوسیت B منفرد تولید می‌شوند.

MAbها اولین بار در سرم بیماران مبتلابه مولتیپل میلوما[۱۶] شناسایی شدند (۶). یک پیشرفت بزرگ در به‌دست آوردن آنتی‌بادی‌هایی که ساختار آن‌ها قابل‌توضیح است، کشف این مسئله بود که بیماران مبتلابه مولتیپل میلوما، اغلب دارای مقادیر زیادی مولکول‌های آنتی‌بادی یکسان در خون و ادرار خود هستند.

ایمونولوژیست‌ها دریافتند که این آنتی‌بادی‌ها را می‌توان خالص‌سازی و آنالیز کرد.

تشخیص اینکه سلول‌های میلوما ایمونوگلوبولین‌های مونوکلونال می‌سازند منجر به توسعه فناوری تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال شد (۱). در اواسط دهه ۱۹۷۰، Kohler و Milstein تکنیکی را برای تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال با ویژگی دلخواه ابداع کردند که برای آن جایزه نوبل دریافت کردند.

آن‌ها سلول‌های لنفوسیت B طحال موش را با سلول‌های لنفوسیت B سرطانی ترکیب کردند تا هیبریدهای نامیرا در in vitro حاصل شود.

البته استفاده از این روش برای تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، به دلیل عوارض جانبی منسوخ شده و فناوری آنتی‌بادی‌های نوترکیب جایگزین آن شده است (۷ , ۸).

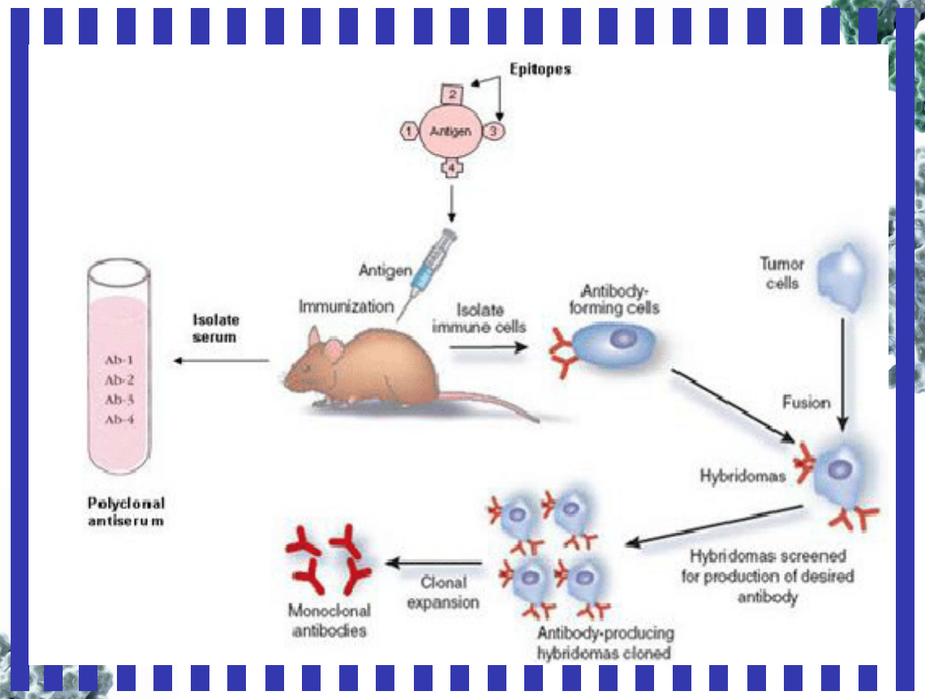
۱۲ Agglutination

۱۳ Epitope

۱۴ Polyclonal

۱۵ Monoclonal

۱۶ مولتیپل میلوما (Multiple myeloma) که به‌عنوان میلوم سلول‌های پلاسما نیز شناخته می‌شود، یک نوع سرطان سلول‌های پلاسما (نوعی گلبول سفید) است. این سلول‌ها به‌طور معمول آنتی‌بادی تولید می‌کنند (۱۹).



شکل ٤. خلاصه تصویری از روش تولید آنتی‌بادی مونوکلونال و پلی‌کلونال (۹)

• کاربرد آنتی‌بادی‌های مونوکلونال

آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کاربردهای تشخیص بر اساس ایمنی نیز بیان می‌کند که تشخیص بسیاری از بیماری‌های عفونی و سیستمیک به تشخیص آنتی‌ژن‌ها یا آنتی‌بادی‌های خاص موجود در خون، ادرار و یا بافت‌ها با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در آزمایش‌های ایمنی‌شناسی متکی است (۱).

درزمینهٔ مصارف درمانی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال باید گفت که پیشرفت در تحقیقات پزشکی منجر به شناسایی سلول‌ها و مولکول‌هایی شده است که در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌ها نقش دارند. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به دلیل ویژگی خاص خود، ابزاری برای هدف قرار دادن این سلول‌ها و مولکول‌ها فراهم می‌کنند.

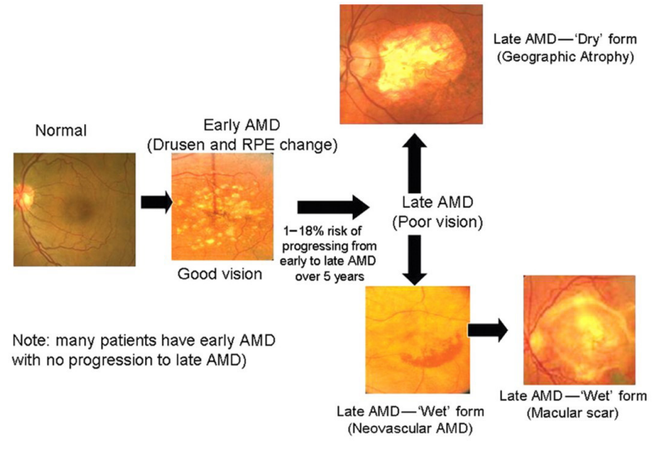
زیادی در زمینه‌های مختلف دارند که می‌توان به مصارف تشخیصی و درمانی آن‌ها اشاره کرد.

از جمله مصارف تشخیصی، شناسایی تومور است؛ به این شکل که از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال نشان‌دار اختصاصی برای پروتئین‌های سلولی مختلف، جهت تعیین منبع بافتی تومورها استفاده می‌شود. از موارد دیگر تشخیصی، شناسایی نشانگرهای فنوتیپی منحصربه‌فرد برای انواع سلول است؛ به‌عنوان مثال طبقه‌بندی مدرن لنفوسیت‌ها و سایر لکوسیت‌ها و شناسایی جمعیت‌های سلولی منفرد آن‌ها بر اساس آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی، است.

بسیاری از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال امروزه به‌صورت درمانی استفاده می‌شوند. برخی از نمونه‌ها عبارت‌اند از آنتی‌بادی‌ها علیه فاکتور نکروز تومور[۱۷] که برای درمان آرتریت روماتوئید و سایر بیماری‌های التهابی استفاده می‌شود، آنتی‌بادی‌ها علیه فاکتور رشد اندوتلیال عروقی یا VEGF[۱۸](سیتوکینی که باعث تحریک آنژیوژنز یا رگ‌زایی می‌شود) در بیماران مبتلا به فرم نئوسکولار بیماری دژنراسیون ماکولای وابسته به سن[۱۹] (nAMD) و برخی تومورها استفاده می‌شود و بسیاری کاربردهای درمانی دیگر دارد (۱).

• جلوگیری از نابینایی با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال

دژنراسیون ماکولای وابسته به سن (AMD) یکی از دلایل اصلی نابینایی در سراسر جهان است. با پیر شدن جمعیت در بسیاری از کشورها، بیش از ۲۰درصد افراد ممکن است به این اختلال مبتلا باشند (۱۰). این بیماری در دو فرم خیس و خشک دیده شده است. فرم خیس یا نئووسکولار که با نئواسکولاریزاسیون مشیمیه[۲۰](CNV) شناخته می‌شود، مسئول نزدیک به ۹۰درصد موارد از دست دادن شدید بینایی است. در این فرم VEGF نقش کلیدی در ایجاد CNV و افزایش نفوذپذیری عروق دارد (۱۱).



شکل ۵. شبکیه چشم سالم (چپ) در مقایسه با مراحل مختلف دژنراسیون ماکولای وابسته به سن (۱۲)

برولوسیزومب[۲۱] که با نام RTH258 نیز شناخته می‌شود، یک آنتی‌بادی از نوع قطعه متغیر تک زنجیره‌ای[۲۲](scFv) است که VEGF را مهار می‌کند (۱۳). همان طور که از نام scFv مشخص است، کوچک‌ترین قطعهٔ متغیر آنتی‌بادی تک زنجیره‌ای است که می‌تواند به‌صورت اختصاصی به آنتی‌ژن هدف خود متصل شود. این مولکول یک آنتی‌بادی تک‌ظرفیتی با وزن مولکولی ۲۵ الی ۳۰کیلودالتون است

۱۷ Tumor necrotic factor (TNF)
۱۸ Vascular endothelial growth factor
۱۹ Neovascular age-related macular degeneration
۲۰ Choroidal Neovascularization
۲۱ Brolucizumab
۲۲ Single-chain variable fragment

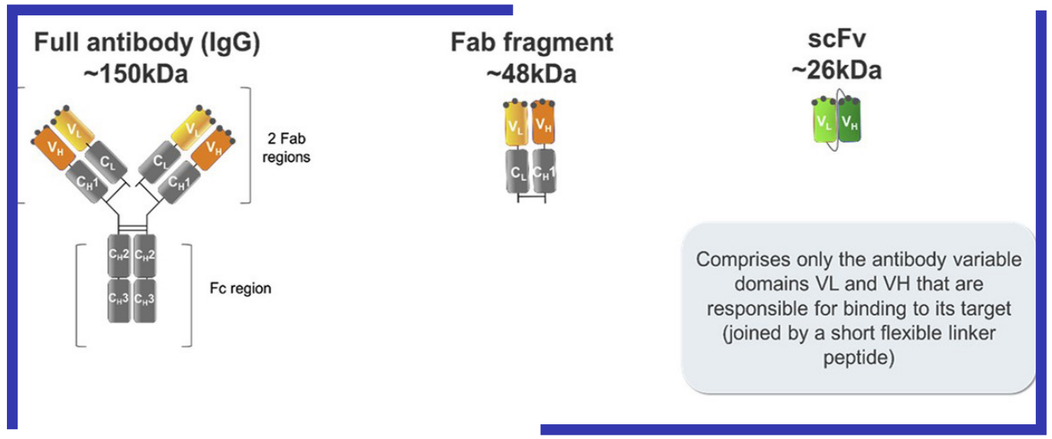
که در آن زنجیره‌های متغیر سبک و زنجیره متغیر سنگین با یک اتصال‌دهندهٔ پپتیدی انعطاف‌پذیر به هم متصل شده‌اند (۸). scFvها انتخاب مناسبی برای درمان دارویی هستند، زیرا اندازه کوچک آن‌ها و فقدان Fc ممکن است مزایای عملکردی خاصی مانند فراهمی زیستی[۲۳] بهبودیافته و کاهش ایمنی‌زایی علیه آنتی‌بادی در داخل بدن داشته باشد.

در واقع، این مولکول‌ها نفوذ بهتری را به بافت هدف نشان داده‌اند که می‌تواند منجر به اثربخشی موضعی بیشتر، ماندگاری بهتر اثر و مواجهه سیستمیک کمتر شود که منجر به عوارض جانبی کمتر در مقایسه با ایمونوگلوبولین با اندازه طبیعی می‌شود (۱۳).

برای تولید برولوسیزومب مثل سایر scFv ها می‌توان از روش بیان پروتئین‌های نوترکیب استفاده کرد.

چندین پلتفرم بیان برای تولید این قطعات نوترکیب به کار می‌روند که از میان آن‌ها سیستم باکتریایی، به‌خصوص باکتری *Escherichia coli*، میزبان امیدوارکننده‌ای است. مزیت این سیستم، توانایی تولید پروتئین در مقادیر نسبی زیاد است.

علاوه بر این، *E. coli* به‌راحتی در دسترس است، به محیط‌های ارزان قیمت و ساده برای رشد سریع نیاز دارد. برای تولید در مقیاس وسیع می‌توان *E. coli* را به‌راحتی در انواع تخمیرکننده‌ها کشت داد (۱۴).

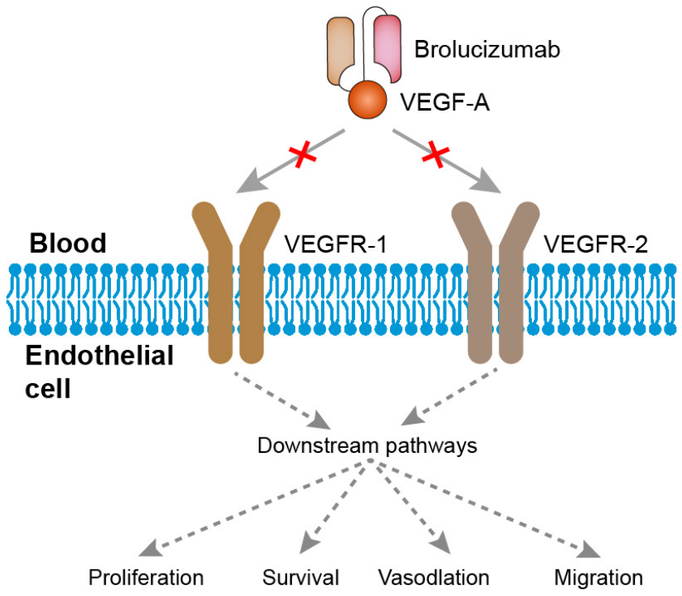


شکل ٦. برولوسیزومب به‌عنوان یک آنتی‌بادی از نوع قطعه متغیر تک زنجیره‌ای. Fab: قطعه اتصال به آنتی‌ژن، Fc: قطعه تبلورپذیر، IgG: ایمونوگلوبین G، ScFv: قطعه متغیر تک زنجیره‌ای VL: منطقه متغیر زنجیره سبک، VH: منطقه متغیر زنجیره سنگین (۱۳)

۲۳ Bioavailability

• برولوسیزومب چگونه عمل می‌کند؟

در مطالعات آزمایشگاهی میل ترکیبی بالای برولوسیزومب برای ایزوفرم‌های متعدد VEGF و در نتیجه خنثی‌سازی اتصال VEGF-A به گیرنده‌های آن؛ یعنی گیرنده‌های VEGFR_1 و VEGFR_2 نشان داده شده است. به عبارتی این آنتی‌بادی با اتصال به مولکول‌های VEGF از اتصال آن‌ها به گیرنده‌های خود جلوگیری می‌کند و با این رقابت، مانع رگ‌زایی در بافت هدف می‌شود. این دارو که توسط شرکت داروسازی NOVARTIS توسعه یافته، مثال کوچکی برای پتانسیل‌های درمانی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال است (۱۳).



شکل ۷. نحوه عملکرد برولوسیزومب (۱۵)

• چرا برولوسیزومب می‌تواند بهترین راه درمان AMD باشد؟

برای بررسی فواید و برتری‌های برولوسیزومب نسبت به سایر داروهای مشابه به دو داروی قدیمی‌تر اشاره می کنیم :

بواسیزومب[۲۴] با نام تجاری اواستین[۲۵] و رانیبیزومب[۲۶] با نام تجاری لوسنتیس[۲۷] هر دو این داروها همانند برولوسیزومب، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال نوترکیب و انسانی علیه VEGF هستند که برای مهار عملکرد آن در سلول‌های اندوتلیال عروقی و در نتیجه مهار رگ‌زایی استفاده می‌شوند (۱۶, ۱۷). تفاوت عمده این داروها در ساختار آن‌ها است.

بواسیزومب یک آنتی‌بادی مونوکلونال کامل است (IgG) که از ۲ زنجیره سبک مشابه (دارای ۲۱۴ آمینو اسید) و ۲ زنجیره سنگین مشابه (دارای ۴۵۳ آمینو اسید) تشکیل شده و وزن مولکولی آن، ۱۴۹کیلودالتون است (۱۶). رانیبیزومب تنها قطعه Fab از یک آنتی‌بادی است و بنابراین وزن مولکولی کمتری

۲۴ Bevacizumab
۲۵ Avastin
۲۶ Ranibizumab
۲۷ Lucentis

(۴۸کیلودالتون) نسبت به بواسیزومب دارد (۱۷).

با وجود این هر دو این داروها در مقایسه با برولوسیزومب که تنها از یک قطعهٔ متغیر تک زنجیره‌ای تشکیل شده است، دارای اندازه بزرگ‌تر و جرم بیشتری هستند. این مسئله باعث می‌شود که نیمه‌عمر و فراهمی زیستی برولوسیزومب به مقدار زیادی بیشتر از این دو دارو باشد.

۶ مورد از آنتی‌بادی‌های رایج در درمان AMD همراه با وزن مولکولی آن‌ها و دز دارو در هر تزریق در شکل ۸، نشان داده شده است (۱۳).

جدول ۱. مقایسه آنتی‌بادی‌های ضد VEGF رایج در درمان فرم نئووسکولار دژنراسیون ماکولای وابسته به سن (۱۳)

Drug (Manufacturer)	Ranibizumab (Novartis [East Hanover, NJ]/Genentech [South San Francisco, CA])	Unlicensed Bevacizumab (Genentech)	Aflibercept (Regeneron, Tarrytown, NY)	Ziv-Aflibercept (Regeneron/Sanofi [Bridgewater Township, NJ])	Conbercept (Chengdu KangHong Biotech [Sichuan, China])	Brolucizumab (Novartis)
Approval for nAMD	FDA approved 2006	Not approved for nAMD	FDA approved 2011	Not approved for nAMD	Approved in China 2013	FDA approved 2019
nAMD Phase 3 trials	MARINA, ANCHOR[23,24]	N/A	VIEW 1, VIEW 2[25]	N/A	PHOENIX[26]	HAWK, HARRIER[49]
Format	Fab fragment	Full antibody (IgG1)	VEGFR1/2-Fc fusion protein	VEGFR1/2-Fc fusion protein	VEGFR1/2-Fc fusion protein	scFv
MOA	Anti–VEGF-A	Anti–VEGF-A	Anti–VEGF-A/PlGF/VEGF-B	Anti–VEGF-A/PlGF/VEGF-B	Anti–VEGF-A/VEGF-B/VEGF-C/and PlGF	Anti–VEGF-A
Molecular structure						
Molecular mass	48 kDa	147 kDa	97–115 kDa	97–115 kDa	143 kDa	26 kDa
Clinical dose for nAMD (mg)	0.5 mg	1.25 mg	2.0 mg	1.25 mg	0.5 mg	6.0 mg
Equivalent number of molecules per injection	0.5	0.4	1.0	0.6	0.2	11

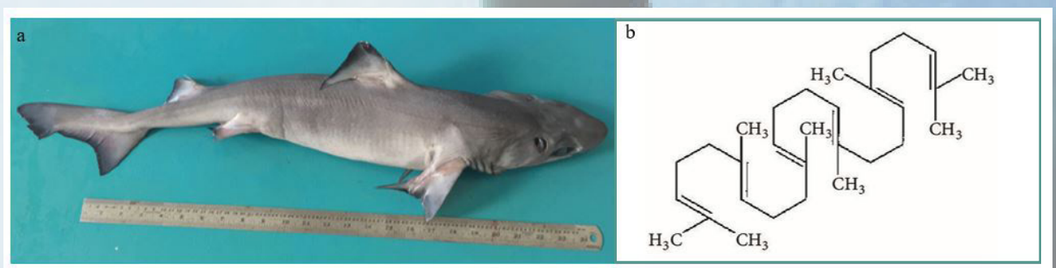
Fab = fragment antigen binding; Fc = fragment crystallizable; FDA = Food and Drug Administration; IgG1 = immunoglobulin G1; MOA = mode of action; N/A = not applicable; nAMD = neovascular age-related macular degeneration; PlGF = placental growth factor; scFv = single-chain variable fragment; VEGF = vascular endothelial growth factor; VEGFR = vascular endothelial growth factor receptor.

به‌عنوان روش درمانی می‌تواند فواید بسیاری داشته باشد. همان‌طور که اشاره شد، این آنتی‌بادی‌ها به دلیل سایز کوچک، نفوذ بافتی بسیار خوبی دارند و علاوه بر آن ماندگاری آن‌ها در بافت نیز بیشتر است. این امر فواصل تجویز دارو را بیشتر کرده و باعث کاهش هزینه‌های تحمیل‌شده بر بیماران و سیستم درمانی می‌شود. محققان در سراسر دنیا در تلاش‌اند تا با طراحی این آنتی‌بادی‌ها علیه بیماری‌های خاص مثل انواع تومورها و بیماری‌های خودایمنی، کیفیت زندگی بیماران را بهبود ببخشند و حتی این بیماری‌ها را کنترل و یا درمان کنند.

اسکوالن میکروبی؛ حامی اکوسیستم دریایی

سیده محبوبه موسوی
دانشجوی دکتری تخصصی بیوتکنولوژی میکروبی دانشگاه الزهرا تهران

هیدروکربنی ایزوپرنوئیدی[1] به نام اسکوالن[2] یک حد واسط حیاتی و پیش‌ساز برای تولید تمام هورمون‌های استروئیدی و کلسترول در گیاهان و جانوران است. این ماده توسط مسیرهای موالونات[3] در یوکاریوت‌ها و برخی باکتری‌ها و مسیر متیل دی‌اریتریول ۴ -فسفات[4] در باکتری، سیانوباکتری‌ها و گیاهان سنتز می‌شود (۱). منبع اصلی تولید اسکوالن، روغن کبد کوسه‌هایی است که در اعماق دریاها زندگی می‌کنند، به‌طوری که ۴۰ تا ۷۰درصد جرم کبد را تشکیل می‌دهند؛ به‌عنوان مثال ۸۳درصد جرم کبد کوسه *Centrophorus moluccensis* از چربی تشکیل شده است که ۹۵درصد آن اسکوالن است (۲). کوسه‌های اعماق دریا، فاقد کیسه شنا هستند و به جای آن روغن‌های کبد، چگالی را کمتر از آب کرده و به شناور ماندن جانور کمک می‌کنند. بهره‌برداری کنترل نشده و شکار کوسه‌ها باعث شده که در حال حاضر بسیاری از گونه‌های این جانور توسط اتحادیه بین‌المللی حفاظت از طبیعت به‌عنوان گونه آسیب‌پذیر طبقه‌بندی شوند (۳).



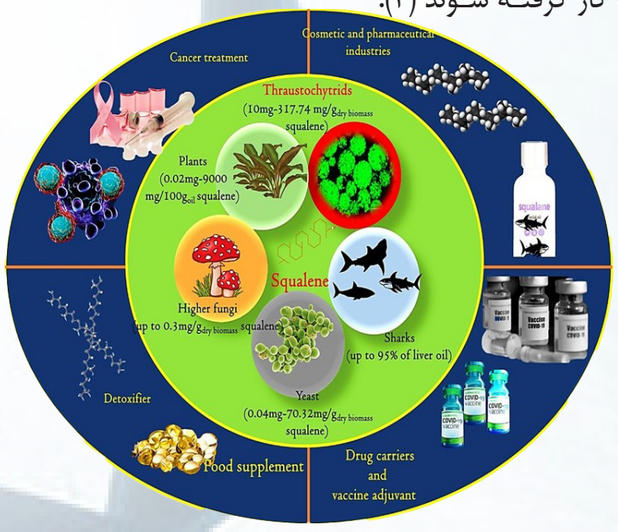
شکل ۱. گونه بالغ *Centrophorus moluccensis* با طول ۷۸۵ میلی‌متر و وزن ۲/۳۴ کیلوگرم (a) و ساختار شیمیایی اسکوالن (b) (برگرفته از منبع ٤ و ٥)

۱ ایزوپرنوئید (Isoprenoid) ترکیبات آلی دو یا چند واحدی هستند که هر واحد آن دارای ۵ کربن است.

۲ Squalene
۳ Mevalonate pathway (MVA)
۴ 2-C-methyl-D-erythritol -4 phosphate (MEP)

• کاربرد اسکوالن

اسکوالن یک آنتی‌اکسیدان طبیعی قوی است که با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی[5]، باعث حفاظت سلول‌ها از آسیب رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (۶). علاوه بر این باعث مهار تومورزایی در روده، ریه‌ها و پوست نیز می‌شود (۷). رژیم غذایی حاوی اسکوالن می‌تواند کلسترولِ تام پلاسما را بدون بالا بردن غلظت تری گلیسیرید افزایش دهد (۸). اسکوالن به‌علت خاصیت نرم‌کنندگی، آنتی‌اکسیدانی و آب‌رسانی در محصولات مراقبت از پوست نیز استفاده می‌شود؛ بنابراین برای پاسخگویی به تقاضای رو به رشد اسکوالن، سالانه ۳ تا ۶ میلیون کوسه کشته می‌شوند و اکوسیستم‌های دریایی را به‌شدت به خطر می‌اندازند. با توجه به کاربردهای گسترده اسکوالن، افزایش هزینه به دلیل کاهش عرضه و نگرانی‌های زیست‌محیطی، نیاز است که جایگزین‌های جدیدی برای تهیه اسکوالن به کار گرفته شوند (۳).



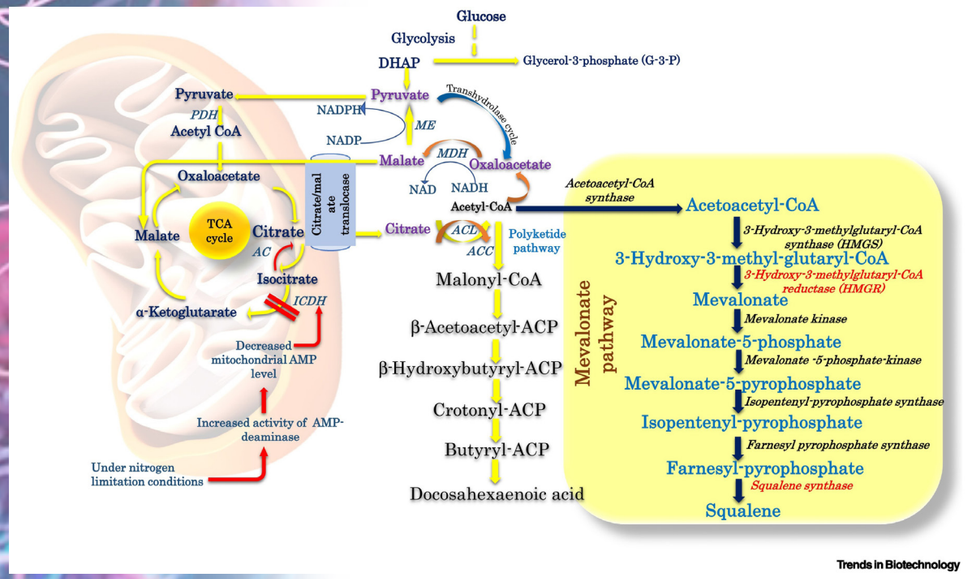
شکل ۲. مقایسهٔ درصد محتوای اسکوالن در کوسه‌ها، گیاهان، قارچ‌ها، مخمرها و پروتیست‌ها[6] (دایره سبز) و معرفی کاربردهای پزشکی، غذایی و آرایشی آن (دایره آبی) (۳).

۵ جداشدن الکترون از لیپیدهای غشای سلولی توسط رادیکال‌های آزاد

۶ Protists

● جایگزین جدیدی برای تهیهٔ اسکوالن

همان طور که در شکل ۲ مشخص شده است، منابع گیاهی و حیوانی در مقایسه با گونه‌های تراستوکیتریدها[۷]، یک جایگزین مناسب جهت تولید اسکوالن هستند؛ اما چرخه رشد گیاهان و جانوران بین شش ماه تا یک سال به طول می‌انجامد تا امکان برداشت فراهم شود (۹). همچنین بازده تولید اسکوالن با استفاده از منابع قارچ و مخمر نیز کمتر از خانواده تراستوکیتریدهای دریایی است. مخمر *Yarrowia lipolytica* و *Saccharomyces cervisiae*، باکتری *Escherichia coli*، میکروجلبک *Botryococcus Braunii* و پروتیست‌های دریایی به نام تراستوکیتریدها از جمله منابع میکروبی تولیدکنندهٔ اسکوالن هستند. با وجود اینکه تولید اسکوالن میکروبی کمتر از اسکوالن گیاهی و حیوانی است، اما به دلیل رشد سریع و سازگاری با مهندسی متابولیک، آن‌ها بهترین گزینه برای جایگزینی هستند. تعداد کمی میکروارگانیسم یافت شده است که قادر به سنتز اسکوالن به میزان ۳۰درصد از وزن خشک توده سلولی است، اما با دستکاری ژنتیکی مسیر بیوسنتز اسکوالن در میکروارگانیسم‌ها، می‌توان این ترکیب پرکاربرد را در مقیاس صنعتی تولید کرد (۳).



شکل ۳. بیوسنتز میکروبی اسکوالن از مسیر موالونات (۳).

۷ Thraustochytrids

● روش‌های افزایش محتوای اسکوالن میکروبی با مهندسی متابولیک

■ بیان بیش از حد ژن آنزیم HMGR

مسیر بیوشیمیایی تولید اسکوالن در یوکاریوت‌هایی مثل مخمر شامل هفت مرحله است. همان طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، در مرحله دوم ۳-هیدروکسی ۳- متیل گلوتاریل کوآ توسط آنزیم HMGR[۸] به موالونات احیا می‌شود. از آنجایی که HMGR یک آنزیم محدودکننده است، بیان بیش از حد آن منجر به افزایش ۳/۲ برابری در تولید اسکوالن می‌شود (۳). علاوه بر این بیان بیش از حد استیل کوآ سنتتاز[۹] و ATP سیترات لیاز[۱۰] همراه با HMGR، باعث افزایش ۵۰درصد مقدار سیتوزولی استیل کوآ و در نهایت افزایش ۱۶/۴ برابری مقدار اسکوالن با بازدهی ۱۰ mg/g_{CDW} می‌شود (۱۰).

■ بیان هم‌زمان HMGR و DGAT

در مطالعه‌ای دیگر، بیان بیش از حد HMGR، در مخمر *Y. lipolytica* باعث افزایش مقدار اسکوالن به میزان ۲۰۸/۸ mg/L شد. سپس با بیان هم‌زمان دی آسیل گلیسرول آسیل ترانسفراز[۱۱] (DGAT)، دو برابر و به میزان ۴۳۹/۱۴ mg/L رسید و از طریق بهینه‌سازی منبع کربن و دما در محیط تخمیری به میزان ۵۱۴/۳۴ mg/L رسید. در نهایت با استفاده از تربینافین[۱۲] به‌عنوان مهارکننده اسکوالن اپوکسیداز[۱۳]، بازده تولید اسکوالن به ۷۳۱/۱۸ mg/L رسید (۱۱).

■ بیان هم‌زمان NADH و HMGR

در تحقیقی دیگر، بیان بیش از حد NADH/HMGR به‌دست آمده از باکتری *Silicibacter pomeroyi* در مخمر *S. cervisiae* منجر به تولید ۱۰۸۶/۳۱ mg/L اسکوالن می‌شود. NADPH به‌عنوان کوفاکتور، باعث محدودیت در بیان هم‌زمان می‌شود. به همین دلیل از بیان بیش از حد NADH در کنار HMGR استفاده می‌شود. بیان هم‌زمان الکل دهیدروژنازی به نام ADH2[۱۴] و استالدئید دهیدروژناز[۱۵] از باکتری *Dickeya zeae* باعث بهبود استفاده از اتانول در کشت Fed–batch[۱۶] و تولید ۹۴۷۲ mg/L اسکوالن شد (۱۲)

■ بیان بیش از حد اسکوالن سنتاز

آنزیم اسکوالن سنتاز آنزیمی متصل به غشاء بوده و مسئول تبدیل فارنسیل پیروفسفات[۱۷] به اسکوالن است. در یک مطالعه، بیان بیش از حد ژن اسکوالن سنتاز به‌دست آمده از *Bacillus megaterium* منجر به افزایش ۲۹ برابری تولید اسکوالن در باکتری *Bacillus subtilis* شد (۱۳).

۸ 3- hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase
۹ Acetyl-CoA synthetase
۱۰ ATP citrate lyase
۱۱ diacylglycerol acyl transferase
۱۲ Terbinafine: یک داروی ضد قارچ است که با مهار اسکوالن اپوکسیداز، سنتز ارگوسترول را متوقف می‌کند.
۱۳ Squalene Epoxidase: آنزیمی که تبدیل اسکوالن به لانوسترول را کاتالیز می‌کند. در قارچ‌ها لانسترول سپس به ارگوسترول تبدیل می‌شود.
۱۴ الکل دهیدروژناز یا ADH جزء آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز است. الکل دهیدروژناز کلاس II(ADH2)یک آنزیم مهم اکسیدکنندهٔ اتانول است.
۱۵ Acetaldehyde dehydrogenase
۱۶ در سیستم کشت Fed-batch، به‌تدریج سوبسترا اضافه شده و محصول تا پایان کار در بیوراکتور باقی می‌ماند.
۱۷ Farnesyl pyrophosphate

■ تنظیم منفی اسکوالن اپوکسیداز

آنزیم اسکوالن اپوکسیداز یک فلاووپروتئین مسئول تبدیل اسکوالن به استرول و استریل[۱۸] استرها است. نتایج یک تحقیق نشان داد که ایجاد جهش در ژن *ERG1* کدکنندهٔ این آنزیم می‌تواند منجر به تنظیم منفی (کاهش بیان) و در نهایت افزایش میزان اسکوالن در تراستوکیتریدهایی به نام *Aurantiochytrium Limacinum SR21* شود (۱۴). بیشتر تراستوکیتریدها، اسکوالن را به‌عنوان یک ترپنوئید ارزشمند برای محافظت از ترکیبات خاصی در برابر اکسیداسیون سنتز می‌کنند (۳).

■ تیمار با متانول

یک مطالعه دیگر نشان می‌دهد که پروتیست *Schizochytrium limacinum B4D1*، یک مشتق با تحمل کم نمک از *S. limacinum SR21* است که تحت تیمار با ۳/۲ درصد متانول، تولید اسکوالن را از $70\ mg/g_{CDW}$ به $100\ mg/g_{CDW}$ افزایش داد (۱۵).

منبع اصلی استخراج اسکوالن از روغن کبد کوسه است که یک گزینه ارزان و متداول است، اما استخراج آن برای اکوسیستم دریایی ناپایدار و مضر است. از طرف دیگر رشد طولانی‌مدت گیاهان، نیاز به زمین مناسب برای کشت، تولید کم اسکوالن و پرهزینه بودن جداسازی و تخلیص آن، جزء محدودیت‌های استفاده از گیاهان است؛ بنابراین استفاده از مهندسی متابولیک، اسکوالن میکروبی را به یک جایگزین امیدوارکننده تبدیل کرده است. از بین میکروارگانیسم‌های تولیدکنندهٔ اسکوالن تراستوکیتریدها به دلیل رشد هتروتروفیکی[۱۹] سریع، عدم تولید اسکوالن سمی و مناسب برای تخمیر در مقیاس تجاری، بهترین گزینه برای تولید اسکوالن است.

۱۸ استرول‌ها ترکیبات لیپیدی هستند که به‌صورت استرول آزاد یا استریل استر (ترکیبات ذخیره‌ای لیپیدهای خنثی) ظاهر می‌شوند.

۱۹ Heterotroph

راه‌های ارتباطی:
DNAmagazine
Biotech.au
DNAmagazine98@gmail.com

دانشگاه الزهرا